

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SABRINA KARIM SILVA

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM *DIABODY* ESPECÍFICO CONTRA
TOXINAS DO VENENO DE *Loxosceles intermedia***

CURITIBA

2016

SABRINA KARIM SILVA

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM *DIABODY* ESPECÍFICO CONTRA
TOXINAS DO VENENO DE *Loxosceles intermedia***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de Concentração em Patologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Larissa Magalhães Alvarenga
Co-Orientadora: Juliana Ferreira de Moura

CURITIBA

2016



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM *DIABODY* ESPECÍFICO
CONTRA TOXINAS DO VENENO DE *Loxosceles intermedia*”**

por

SABRINA KARIM SILVA

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia
e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**


Prof^ª. Dr^a. Larissa Magalhães Alvarenga - Presidente


Dr^a. Priscilla Fanini Wowk


Prof^ª. Dr^a. Adriana Frohlich Mercadante

Curitiba, 13 de junho de 2016

*À Deus por ser meu amigo em todas
as horas e nunca ter saído do meu lado.*

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por todas as bênçãos da minha vida, pois sem ele nada seria.

À professora **Larissa**, minha orientadora, por acreditar em mim, pelo companheirismo, amizade, paciência...

À minha co-orientadora, professora **Juliana**, pelo apoio e por compartilhar opiniões e conhecimento.

Ao professor Marcel pelos conselhos e apoio.

À minha **mãezinha**, meu alicerce, um exemplo de vida e; ao meu **pai** por todo carinho.

Aos meus irmãos **Alex**, **Sam** e **Sara Aline** que me apoiaram e entenderam os momentos que não pude estar com eles.

À todos do laboratório de imunoquímica.... **Alessandra**, **Isabel**, **Rafaela**, **Michele**, **Carla**, **Juliana**, **Maíra**, **Luís**, **Fábio**.....vocês fizeram parte dessa história, não teria conseguido sem o apoio e a ajuda de vocês.

Aos meus **colegas de trabalho** que estiveram comigo nas madrugadas do HC das clínicas.

À todos aqueles que direta ou indiretamente participaram dessa pesquisa.

Ao **Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia** e todos os professores do mesmo que se dedicam e tornam possível a realização desse trabalho.

Ao **CPPI** – Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiologia pelos soros, venenos, por apoiar e incentivar a pesquisa no Brasil.

Às agências de fomento: **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por contribuírem com a pesquisa do nosso país.

À **UFPR** por ter propiciado com que a realização desse trabalho fosse possível.

RESUMO

Aranhas do gênero *Loxosceles* possuem distribuição mundial e são consideradas de grande importância médica. O envenenamento (loxoscelismo) pode resultar em lesões dermonecroticas, falência renal, distúrbios hematológicos e, em crianças, pode ser fatal. No Brasil, o loxoscelismo é considerado um sério problema de saúde pública causado por 3 principais espécies (*L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta*), responsáveis por mais de 6.000 casos/ano. O perfil de envenenamento pode variar conforme as características da aranha ou do paciente e a soroterapia, a partir da imunização do cavalo, ainda é utilizada há décadas como tratamento específico. Atualmente, tem-se como terapia para diversas doenças o uso de fragmentos únicos de cadeias variáveis (scFv) de anticorpos que podem ser obtidos a partir de tecnologia recombinante. Esses fragmentos são candidatos ideais para a neutralização de substâncias tóxicas provenientes de envenenamento, pois possuem baixa massa molecular, rápida difusão no tecido e são estáveis. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho é desenhar um anticorpo recombinante (LimAb7 *diabody*) a partir do monoclonal murino LimAb7 já caracterizado previamente. Para tanto, fez-se necessário realizar a clonagem a partir do cDNA obtidos de hibridomas secretores de LimAb7 e expressar o recombinante em bactérias *E. coli* AD494. ELISA, *Imunoblotting*, inibição da atividade de esfingomielinase pelo kit Amplex Red® e neutralização de hemólise foram realizados com intuito de avaliar a capacidade funcional da molécula recombinante. Pode-se observar por *Western blotting* que, o LimAb7 *diabody* reconhece proteínas de aproximadamente 30kDa, sendo consideradas as responsáveis por causarem dermonecrose. Verificou-se também que o recombinante neutraliza a atividade esfingomielinásica do veneno e dessa forma, inibe a hemólise induzida pela ação do mesmo. Com isso, os resultados mostraram-se promissores para que o anticorpo recombinante possa vir a ser utilizado nos acidentes loxoscélicos.

Palavras chave: scFv, aranha marrom, anticorpo recombinante, antiveneno

ABSTRACT

Spiders of the genus *Loxosceles* have worldwide distribution and are considered of great medical importance. Poisoning (loxoscelism) can result in dermonecrotic injuries, renal failure, hematological disorders, and maybe fatal in children. The loxoscelism is considered a serious public health problem in Brazil where three main species are found (*L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta*) account for more than 6,000 cases / year. Poisoning profile can be varied according to the characteristics of the spider or the patient. The horse antivenom has been still used for decades as a specific treatment. Currently, it is thought therapy for various diseases using single chain variable fragments (scFv) antibodies which can be obtained from recombinant technology. These fragments are ideal candidates for the neutralization of toxic poisoning from substances because they have low molecular weight, rapid diffusion in the tissue and are stable. In this context, the aim of this work was to design a recombinant antibody (LimAb7 *diabody*) from a murine monoclonal LimAb7 previously characterized as a neutralizing molecule. Therefore, it was necessary to perform cloning from cDNA of LimAb7 secreting hybridomas and the expression of recombinant protein in *E. coli* AD494. ELISA, immunoblotting, inhibition of sphingomyelinase activity by Amplex Red kit and hemolysis neutralization assay were performed in order to assess the functional capacity of the recombinant molecule. It was possible to verify Western blotting that the LimAb7 *diabody* recognizes a 30kDa protein, considered as being responsible for causing dermonecrosis. It was also found that the recombinant antibody neutralizes sphingomyelinase activity and thus inhibits the hemolysis induced by the venom. Thus, based on the results, the recombinant antibody therapy may have promising potential in in loxoscelic accidents.

Keywords: scFv, brown spider, recombinant antibody, antivenom

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: <i>Loxosceles</i> spp.	15
FIGURA 2: Fosfolipase D	16
FIGURA 3: Loxoscelismo.	19
FIGURA 4: Fragmentos de anticorpos recombinantes.	25
FIGURA 5: Fragmento único de cadeia variável.	25
FIGURA 6: Construção de fragmentos de anticorpos recombinantes	36
FIGURA 7: Identificação do CDR	37
FIGURA 8: Design do gene sintético do anticorpo recombinante:	38
FIGURA 9: <i>Western blotting</i>	39
FIGURA 10: Avaliação das melhores condições de extração e purificação	40
FIGURA 11: <i>Western blotting</i>	41
FIGURA 12: Ensaio de esfingomielinase	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Notificações de acidentes por animais peçonhentos por tipo de aranha e região do Brasil, segundo UF de ocorrência, no período entre 2001 e 2012.	14
TABELA 2: Tratamento proposto pelo Ministério da Saúde para acidentes causados por aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 EPIDEMIOLOGIA	13
2.2 ARANHAS DO GÊNERO LOXOSCELES	14
2.2.1 Características gerais	14
2.2.2 Composição do veneno	15
2.2.3 Efeitos biológicos do veneno	17
2.3 ACIDENTES CAUSADOS POR ARANHAS LOXOSCELES	18
2.3.1 Loxoscelismo	18
2.3.2 Diagnóstico	20
2.3.3 Tratamento	20
2.4 ANTICORPOS RECOMBINANTES	23
3 JUSTIFICATIVA	27
4 OBJETIVOS	28
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5 MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
5.2 VENENOS E ANTICORPOS	29
5.3 CONSTRUÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES	30
5.4 EXPRESSÃO DO DIABODY	31
5.4.1 Protocolo de expressão	31
5.4.2 Caracterização dos diferentes extratos protéicos contendo o <i>diabody</i>	32
5.5 PURIFICAÇÃO E DETECÇÃO DO LIMab7 DIABODY	32
5.6. CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA	33
5.6.1. Ensaio imunoenzimático ELISA	33
5.6.2 <i>Imunoblotting</i>	34
5.6.2.1 <i>Dot blot</i>	34
5.6.2.2 <i>Western blotting</i>	34
5.7 NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA	35
5.8 NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA	35
6 RESULTADOS	36

6.1 SEQUENCIAMENTO E CONSTRUÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES	36
6.2 EXPRESSÃO PERIPLASMÁTICA, PURIFICAÇÃO E DETECÇÃO DO DIABODY LIMAB7	38
6.3 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO LIMAB7 FRENTE AOS VENENOS DE LOXOSCELES	40
6.4 NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE ESFINGOMIELINASE	41
6.5 NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA	42
7 DISCUSSÃO	44
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO	56
ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO	63
ANEXO 3 – BULA SORO ANTILOXOSCÉLICO	64

1 INTRODUÇÃO

Loxoscelismo, araquidismo necrótico ou gangrenoso são alguns dos termos utilizados para descrever acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles*, que atualmente é a forma de araneísmo mais importante em alguns países no mundo. Os registros iniciais de acidentes envolvendo *Loxosceles* no Brasil foram feitos no ano de 1954 por BÜCHERL & ROSENFELD (RIBEIRO, 2007). Em 2007, cerca de 70% dos agravos notificados por animais peçonhentos no Paraná foram causados por aranhas do gênero *Loxosceles* (PINTO et al., 2009). Nas regiões sul e sudeste, principalmente no estado do Paraná, são registrados mais de 6.000 casos de acidentes por ano, sendo considerado um problema de saúde pública no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os acidentes são classificados em quadro clínico cutâneo e sistêmico. A forma cutânea (73% dos casos) é caracterizada por edema, formação de bolha, eritema, equimose e palidez (placa marmórea). Após alguns dias ocorre formação de uma área necrótica e formação de úlcera que varia de tamanho. O quadro sistêmico ocorre com menos frequência (27%) caracterizando por astenia, febre, cefaleia, alterações sensoriais, insônia e coma. Em casos mais graves, pode levar a distúrbios hematológicos, falência renal e morte (OKAMOTO, 2012; GREMSKI et al., 2014).

Até hoje, o tratamento mais eficaz para o loxoscelismo ainda é discutível, principalmente quando é levada em consideração a dificuldade de identificação e/ou captura do agente responsável pelo acidente, assim como o tempo desde a picada até a procura por assistência médica. Dentre os tratamentos já recomendados estão: antibióticos, vasodilatadores, anti-histamínicos, corticoides, realização de excisão cirúrgica, transfusões sanguíneas, diálises, assim como uso de antivenenos (PAULI et al., 2006, 2009).

Apesar das diferentes intervenções propostas, o uso de antivenenos é o tratamento específico mais usado no Brasil e considerado o de melhor resultado desde que administrado poucas horas após a picada (PAULI et al., 2006, 2009). Uma grande vantagem no uso de antivenenos é a possibilidade de direcionar o tratamento às espécies causadoras, o que não ocorre nas demais formas de terapia (BRAZ et al., 2008). No entanto, dentre as imunoglobulinas totais equinas utilizadas

uma pequena parte trata-se efetivamente de anticorpos dirigidos contra as toxinas presentes no veneno. Autores como Chow e Casadevall (2012) e Lovrecek e Tomic (2011) ressaltam que anticorpos monoclonais podem ser uma ferramenta empregada na neutralização de venenos, e que talvez no futuro, possam substituir a produção de soros heterólogos.

A engenharia molecular tem desenvolvido fragmentos recombinantes de anticorpos a partir de monoclonais que vem sendo empregados por apresentarem potencial terapêutico. Esses avanços são refletidos no número de anticorpos monoclonais e recombinantes utilizados no tratamento e diagnóstico de doenças inflamatórias, cardiovasculares, infecciosas e tumores (CHOW e CASADEVALL, 2012).

Os fragmentos únicos de cadeia variável (scFv) são pequenas estruturas que possuem habilidade de se ligar ao antígeno. Eles consistem do domínio variável da cadeia pesada (VH) unido ao domínio variável da cadeia leve (VL) por um *linker* de peptídeos o qual assegura sua estabilidade (MARTIN, PETER 2000; AUBREY et al., 2003).

O desenvolvimento dos scFv para acidentes com escorpião (TOMMASO *et al.*, 2012) e serpente (RONCOLATO *et al.*, 2013) encorajam para a produção de uma molécula recombinante no uso terapêutico de acidentes com aranhas *Loxosceles*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

Existem mais de 25 mil espécies de aranhas venenosas em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), quatro gêneros de aranhas podem causar envenenamento no ser humano: *Latrodectus spp.* (viúva negra), *Loxosceles spp.* (aranha marrom/reclusa), *Atrax e Hadronyche spp.* (aranha teia de funil) e *Phoneutria spp.* (armadeira). No Brasil não foram reportados acidentes com *Atrax e Hadronyche spp.* (CHAGAS et al., 2010; LISE, GARCIA, 2007; LOVRECEK e TOMIC, 2011).

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família Sicariidae, ordem Araneida, classe Arachnida e filo Arthropoda. Essas aranhas possuem ampla distribuição geográfica sendo descritas aproximadamente 130 espécies em diversas partes do mundo. Dentre as espécies de *Loxosceles* comumente citadas pela capacidade de gerar o efeito dermonecrótico ou por sua grande distribuição e contato com ambientes humanos, são bem conhecidas: *L. laeta* (Chile, Peru, Brasil), *L. gaucho* (Brasil), *L. reclusa* (estados centrais e sul dos Estados Unidos da América), *L. deserta* (Estados Unidos da América e México), *L. rufescens* (Espanha), *L. hirsuta* (Brasil) e *L. intermedia* (Brasil). Cada espécie tem características e distribuições próprias, no entanto, é importante ressaltar que dentre as 12 espécies prevalentes no Brasil e no estado do Paraná, *L. intermedia* (MELLO-LEITÃO, 1934) é a mais abundante (MARQUES-DA-DILVA e FISCHER, 2005; FELICORI et al., 2009; RIVERA et al., 2015).

Desde 2001, o Brasil vem apresentando um aumento no número de casos e, isto pode estar associado ao desequilíbrio ecológico associado ao desflorestamento, extinção de predadores naturais, mudança climática, práticas de manejo de pragas, o qual resulta na adaptação da aranha ao ambiente urbano. Acredita-se que a dispersão dessas aranhas foi altamente facilitada pela sua proliferação em madeiras, tijolos, telhas e dessa forma, serem transportadas para outras áreas geográficas (ANDRADE e TAMBOURGI, 2003; GREMSKI et al., 2014).

Segundo dados do Ministério da Saúde (2014), no Brasil, entre o período de 2001 a 2012, foram notificados 240.903 casos de acidentes por aranhas, sendo que 92% (n=223.368) foram registrados nas regiões Sul e Sudeste. Dentre os tipos de

aranha notificada às do gênero *Loxosceles* sp correspondem a 38% (n=92.028) (TABELA 1).

TABELA 1: Notificações de acidentes por animais peçonhentos por tipo de aranha e região do Brasil, segundo UF de ocorrência, no período entre 2001 e 2012.

Gênero Aranha	Norte	Nordeste	Centro -oeste	Sudeste	Sul	Total	Frequência
Ignorado/Branco	3315	5083	2428	29283	37989	78098	32%
<i>Phoneutria</i>	745	440	367	11496	20546	33594	14%
<i>Loxosceles</i>	885	757	435	4863	85088	92028	38%
<i>Latrodectus</i>	80	263	43	343	261	990	0%
Outra espécie	923	1237	534	8005	25494	36193	15%
Total	5948	7780	3807	53990	169378	240903	100%
Frequência	2%	3%	2%	22%	70%		

FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE/SINAN, 2014.

O Sul do país registrou o maior número de casos de loxoscelismo, com aproximadamente 92% (n=85.088), sendo o Paraná, o estado com maior número de notificações (76%). No período de 12 anos (2001 a 2012) foram registrados somente no estado do Paraná 148.130 notificações de acidentes causados por animais peçonhentos. Sendo que, 43,65% (n=64.668) são por aranhas do gênero *Loxosceles* e, desses 30.272 provenientes de Curitiba.

2.2 ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES*

2.2.1 Características gerais

O nome *Loxosceles* significa “pernas inclinadas”, e refere-se à maneira como a aranha posiciona suas pernas em relação ao resto do corpo. Essas aranhas variam de 1-5 cm de comprimento, possuem evidente dimorfismo sexual, sendo a fêmea maior que o macho. Possuem uma coloração castanha, sendo popularmente denominada “aranha marrom” e, no cefalotórax há uma imagem que se assemelha a um violino. Apresentam seis olhos dispostos em pares que não se tocam e ficam em forma de U padrão (FIGURA 1). Este posicionamento do olho tem sido descrito como critério para identificar as aranhas-marrons. Podem viver por meses sem alimentos ou água e resistir à variação de temperatura entre 8-43 °C. As fêmeas possuem longevidade de 1176±478 dias e os machos de 557±87 dias (*L. intermedia*). Elas constroem teias irregulares que se assemelham a algodão. Alimentam-se de

baratas, grilos, mas preferem presas mortas (TAMBOURGI et al., 2010; MARTINS et al., 2011; GREMSKI et al., 2014).



FIGURA 1: *Loxosceles* spp. – “aranha marrom” adulto (A); aparência em forma de violino da superfície dorsal do cefalotórax (B), ; olhos em pares dispostos em formato de “U” (C).
 FONTE: a autora (A); adaptado de Gremski et al, 2014. (B); adaptado de Moreira, 2008 (C).

2.2.2 Composição do veneno

O volume de veneno produzido contém aproximadamente 20-200 µg de proteína total. O volume e o conteúdo de veneno produzido dependem do sexo, idade, espécie, estado nutricional e tamanho da aranha (revisado por GREMSKI et al., 2014).

O veneno possui uma mistura complexa de toxinas com moléculas altamente expressas como as fosfolipases D, astacinas (metaloproteinases) e peptídeos inseticidas de baixa massa molecular, como também toxinas com baixo nível de expressão como hialuronidase, serino protease, inibidores de serino protease, alergenicos e membros da família TCTP (Tumor Translacionalmente Controlado) (FELICORI et al., 2009; GREMSKI et al., 2014).

A fosfolipase D (PLD), 25-35 kDa, foi identificada como principal componente ativo do veneno de *Loxosceles*. As PLDs são solúveis em água e tampões fisiológicos e catalisam a hidrólise de fosfolípidios como a esfingomielina na ligação fosfodiéster liberando colina e produzindo ceramida 1-fosfato (C1P). C1P estimula proliferação celular, inibe apoptose, induz migração celular e promove inflamação. PLD também pode atuar na hidrolização da lisofosfatidilcolina (LPC) dependente de Mg^{+2} para aumentar o ácido lisofosfatídico (LPA). LPA pode induzir agregação plaquetária, secreção de citocinas e quimiocinas, hiperpermeabilidade endotelial, quimiotaxia, inflamação, angiogênese e progressão do tumores. Sabe-se que LPC e LPA contribuem para a patogênese da PLDs. No início acreditava-se que as fosfolipases clivavam apenas esfingomielina, por isso denominado esfingomielinase;

porém outros grupos são clivados como glicerofosfolipídios e lisofosfolipídios. Desse modo, alguns autores acreditam que o termo fosfolipase D (PLD) é o mais apropriado (GREMSKI *et al.*, 2014; RIVERA *et al.*, 2015).

A PLD possui diferentes isoformas conforme cada espécie, entretanto, alguns aminoácidos são conservados e participam do sítio catalítico como: His12, Glu32, Asp34, Asp91, His47, Asp 52, Trp 230, Asp233, Asn252. A PLD possui 8 folhas beta e 8 alfa hélice (α/β)₈ em formato de barril e o *loop* é estabilizado por pontes de dissulfeto, com sítio catalítico na interface mediado por ligação de íons metálicos e dois resíduos de histidina envolvidos na estabilização e hidrólise da esfingomielina e LPC (FIGURA 2). O íon Mg^{2+} é essencial para catálise e este sítio também é conservado. Acredita-se que além das isoformas, pontes dissulfeto adicionais conforme cada espécie pode acarretar em variações nas afinidades ou atividades enzimáticas, o que explica a diferença dos sintomas clínicos, severidade observada no local da picada, como também os efeitos sistêmicos apresentados após o envenenamento por diferentes espécies do gênero *Loxosceles* (MURAKAMI *et al.*, 2005; TAMBOURGI, 2010; GREMSKI *et al.*, 2014).

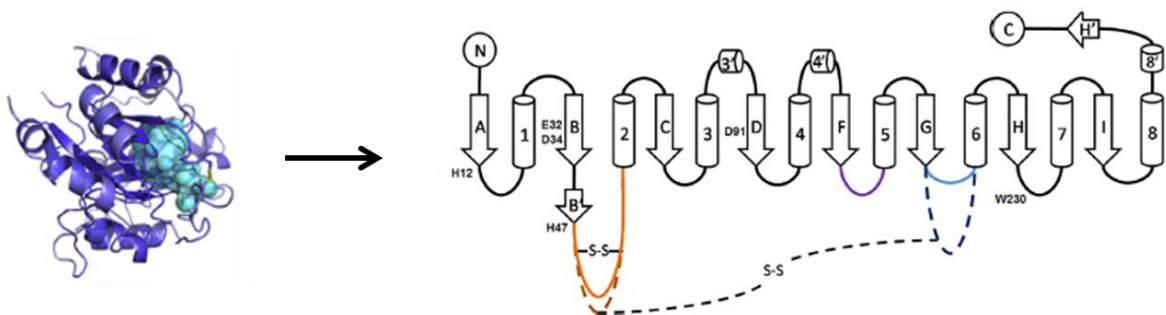


FIGURA 2: Fosfolipase D – representação da estrutura da toxina de *L. laeta* (esquerda). Topologia estrutural da fosfolipase D mostrando as folhas beta e alfa hélice que irão formar a proteína em formato de barril (direita).

FONTE: adaptado de GREMSKI *et al.*, 2014

Tratando-se dos demais componentes do veneno, as **astacinas** são metaloproteases dependentes de zinco. Em *L. intermedia* foram identificadas Loxolisina A que degrada fibronectina e fibrinogênio e Loxolisina B com atividade genolítica. As toxinas **ICK** (Inibidor da Cistina *Knot*) atuam em canais iônicos, como sódio, cálcio e potássio. As **TCTP** liberam histaminas e a partir da sua recombinante foram demonstrados edema e aumento da permeabilidade vascular. **Hialuronidase** degrada ácido hialurônico (HA), que é um componente da matriz extracelular (MEC). Dessa forma, o veneno age na matriz e aumenta a difusão de outras toxinas no local

da inoculação, contribuindo para o espalhamento do veneno. No envenenamento a presença de edema, eritema e necrose é comum, o qual indica distúrbio na MEC. Apresentam ainda, **serino proteases** que atuam como zimogênio ativado pela tripsina. Acredita-se que essas enzimas ativam o complemento e estão relacionadas com coagulação sanguínea e fibrinólise. Os **inibidores de serino protease** presentes no veneno possuem função de proteção para suas próprias proteínas. Apesar de o veneno possuir **alergenos**, estes são pouco relatados nos acidentes loxoscélicos (revisado por GREMSKI et al., 2014).

Ainda se tem muito que descobrir sobre o veneno e sua ação tóxica, por isso alguns autores vêm usando tecnologias de DNA recombinante para esclarecer o papel das mesmas. Kalapothakis et al. (2002) identificou e caracterizou a LiD1, uma proteína expressa na glândula do veneno de *L. intermedia*, pertencente a família de proteínas com atividade dermonecrótica. Em 2006, Felicori et al., produziram a proteína recombinante (recLiD1) com intuito de conhecer os resíduos que participam do sítio ativo da toxina e, com isso encontrar regiões antigênicas que poderiam servir como epítomos para indução de anticorpos recombinantes. A mutação sítio dirigida, LiRecDT1H12A (KUSMA et al., 2008), da proteína recombinante LiRecDT1 (CHAIM et al., 2006), foi de grande importância, pois permitiu a elucidação do papel deste aminoácido na atividade catalítica da toxina.

2.2.3 Efeitos biológicos do veneno

Para avaliar os efeitos biológicos do veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* são utilizados modelos *in vivo* e *in vitro*. Gremski et al. (2014) em sua revisão de literatura, cita que alguns autores notaram que coelhos expostos ao veneno apresentam edema inicial sobre a derme, aumento da permeabilidade vascular, deposição da rede de fibrina, trombose de vasos sanguíneos, degeneração da parede dos vasos bem como infiltração e agregação de células inflamatórias, principalmente neutrófilos. Em tempos de exposição mais longos pode acontecer mionecrose de miofibrilas, infiltração leucocitária no músculo esquelético e, finalmente destruição da integridade da epiderme, hemorragia massiva observando necrose de colágeno em torno da epiderme.

Experimentos com HUVEC (células endoteliais de veia umbilical) apontam que o veneno estimula expressão de E-selectina de células endoteliais e secreção

de IL-8 por macrófagos (PATEL et al., 1994 apud GREMSKI et al., 2014). A partir de culturas de fibroblastos expostos a PLD recombinante observou-se desregulação de *IL6*, *IL8*, *CXCL1*, *CXCL2* que são importantes ativadores inflamatórios. Os autores postulam que junto com o endotélio, os fibroblastos na derme também medeiam a desregulação e ativação dos leucócitos envolvidos na dermonecrose (DRAGULEV et al., 2007 apud GREMSKI et al., 2014). A ligação direta do veneno na superfície de células endoteliais também foi reportada. Assim como, a internalização das toxinas envolvendo vesículas endocíticas que levam ao lisossomo e culmina em morte por apoptose (PALUDO et al., 2006; NOWATZKI et al., 2010 apud GREMSKI et al., 2014).

Referente à ação do veneno sobre os eritrócitos, acredita-se que a hemólise está associada com mecanismo distinto, seja por efeito direto (CHAVES-MOREIRA, 2009) ou dependente de complemento (TAMBOURGI, 2000). Tambourgi et al. (2000), mostraram que a atividade hemolítica pode ser transferida para uma população de células não expostas, explicando dessa forma, a hemólise sistêmica observada após o envenenamento.

2.3 ACIDENTES CAUSADOS POR ARANHAS *LOXOSCELES*

2.3.1 Loxoscelismo

As *Loxosceles* podem ser encontradas peridomiciliar e intradomiciliariamente em brechas, fendas e orifícios de casas, procurando abrigo em caixas, cantos de armários e gavetas, dentro de roupas, toalhas e roupas de cama. Possuem hábitos noturnos, não sendo agressivas, desde que não se sintam ameaçadas. O acidente, denominado loxoscelismo, ocorre quando a aranha é pressionada contra o corpo da vítima, dessa forma os locais mais atingidos são tronco, coxas e braços (MARQUES-DA-SILVA, FISCHER 2005; RIBEIRO, 2007; OKAMOTO, 2012).

A gravidade do acidente pode ser influenciada por fatores que envolvem a aranha (estágio de desenvolvimento, sexo, quantidade de veneno injetado, espécie) e/ou o paciente (local de envenenamento, tecido adiposo e extremidades são mais sensíveis, idade e constituição genética) (MACHADO et al., 2005; TAMBOURGI, 2000, 2010). A maioria dos envenenamentos com sintomas é causada por aranhas

fêmeas, devido à quantidade de veneno liberado ser maior do que a do macho. A aranha injeta não mais que 30 µg de proteína (CHAGAS et al., 2010).

O envenenamento por *Loxosceles* divide-se em quadro clínico cutâneo/dermonecrótico e quadro cutâneo-visceral/sistêmico (hemolítico). O quadro cutâneo, que corresponde a 87 – 98% dos casos é caracterizado inicialmente entre 2 a 8 horas por dor, queimação e formação de uma região edemaciada associada a eritema. Esses sintomas acentuam-se nas primeiras 24 a 72 horas após o acidente, podendo levar a 3 tipos de lesão: incaracterística (bolha serosa, edema, calor e rubor, com ou sem dor e queimação); sugestiva (enduração, bolha, equimose e dor tipo queimação); característica (dor em queimação, lesões hemorrágicas focais, mescladas com áreas pálidas de isquemia, denominando placa marmórea e, evoluir para necrose). A úlcera causada pelo loxoscelismo requer meses até cicatrização (FIGURA 3) (TAMBOURGI, 2000; BRASIL, 2001, 2009; RIBEIRO, 2007; PINTO, 2009).

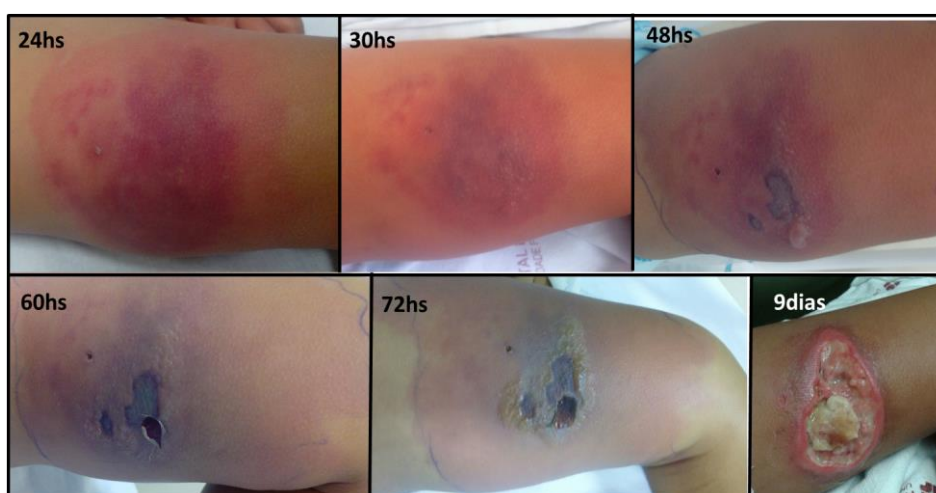


FIGURA 3: Loxoscelismo - evolução da lesão causada pela picada da aranha *Loxosceles* em região de coxa esquerda de uma criança de 3 anos e 5 meses.

FONTE: a autora

O quadro clínico cutâneo-visceral ou sistêmico ocorre com menor frequência (1-13%) nos casos de envenenamento por *Loxosceles*, sendo que a espécie comumente envolvida é a *L. laeta* (CABRERIZO et al., 2009; RIBEIRO, 2007). Nas primeiras 24 horas após a picada podem surgir sintomas como: astenia, febre, êmese, cefaléia, alterações sensoriais, insônia e coma. Manifestações de maior gravidade incluem alterações no quadro hematológico caracterizadas por anemia, icterícia, hemoglobinúria, neutropenia, agregação plaquetária e, conseqüentemente, trombocitopenia além de coagulação intravascular disseminada (BRASIL, 2001,

2009; RIBEIRO, 2007; PINTO, 2009). Manifestações sistêmicas envolvendo alterações renais podem acarretar Insuficiência Renal Aguda (IRA) (hemoglobinúria e hematúria) e até mesmo obstrução do lúmen tubular (IRA oligúrica ou não oligúrica). Sintomas como febre, náuseas, vômito e convulsões têm sido reportados, sugerindo atuação do veneno no sistema nervoso central (BRASIL, 2001, 2009; RIBEIRO, 2007; PINTO, 2009).

2.3.2 Diagnóstico

Apesar de alguns resultados laboratoriais sugerirem os efeitos sistêmicos do loxoscelismo, ainda não existe nenhum diagnóstico específico para o loxoscelismo, portanto este se baseia em três aspectos (CABRERIZO et al., 2009; GREMSKI et al., 2014):

- Lesão compatível: depende dos estágios da lesão, tempo do acidente e localização da picada.
- Epidemiologia: corresponde a características próprias do gênero *Loxosceles*, como seu habitat.
- Identificação do aracnídeo: captura da aranha, o que é dificultoso, pois sua picada é indolor.

Alguns autores têm trabalhado com intuito de desenvolver testes capazes de detectar veneno no local da picada (KRYWKO e GOMEZ, 2002; McGLASSON et al., 2009; WASSERMAN et al., 2009) e em amostras de sangue humano contendo veneno loxoscélicos (GOMEZ et al., 2002; JIACOMINI et al., 2016), mas nenhum deles encontra-se disponível para uso, pois alguns precisam ser melhorados no que diz respeito a sensibilidade e detecção de um número maior de espécies de aranhas causadoras do loxoscelismo.

2.3.3 Tratamento

Não existe nenhum consenso para o tratamento do loxoscelismo e diferentes terapias são propostas de acordo com cada país. No Chile, apesar dos corticoides não inativarem o veneno, quase todos os pacientes recebem esse medicamento associado com anti-histamínicos, e apenas 3,5% recebem soro. No México é prescrito dapsona (usada para tratamento de hanseníase) para todos os pacientes.

Essa droga é recomendada por limitar a migração e infiltração de neutrófilos no local da picada, porém seus efeitos são severos e devem ser administrados sobre supervisão. Os EUA, diferente de outros países, utilizam antibiótico para tratar as lesões com intuito de prevenir infecção (PAULI et al., 2006; GREMSKI et al., 2014).

Contudo, a terapia específica mais utilizada é o uso de antiveneno contra *Loxosceles*, os quais estão disponíveis no Brasil, México, Argentina (antiveneno derivado de cavalo (Fab')₂) e Peru (antiveneno IgG total). Os antivenenos tem sido produzidos no Brasil desde a década de 60 por Furlanetto (1961). Atualmente, o Ministério da Saúde disponibiliza dois antivenenos: soro antiloxoscélico (anticorpos contra os venenos de *L. intermedia*, *L. gauch*o e *L. laeta*), produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Estado do Paraná e; soro antiaracnídeo produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo (contra venenos de *Loxosceles gauch*o, *Phoneutria nigriventer*, *Tityus serrulatu* e *Tityus bahiensis*). Existem também, dois outros produtores comerciais de antivenenos *Loxosceles*: o Instituto Nacional de Saúde, em Lima/Peru (produzido a partir do veneno de *L. laeta*); e o Instituto Bioclon, no México (PAULI et al., 2006; GREMSKI et al., 2014; DUARTE et a., 2015).

O tratamento proposto pelo Ministério da Saúde para o loxoscelismo é realizado de acordo com a seguinte classificação: leve (lesão incaracterística, sem alterações laboratoriais), moderado (lesão sugestiva ou característica, podendo ou não haver alterações sistêmicas) e grave (lesão característica e alteração laboratorial). Sendo que, apenas nos casos moderados e graves é administrada a soroterapia e corticoterapia (TABELA 2) (BRASIL 2001, 2009).

TABELA 2: Tratamento proposto pelo Ministério da Saúde para acidentes causados por aranhas do gênero *Loxosceles*.

Acidente	Soro	Gravidade	Nº ampolas
Loxoscelismo	Antiloxoscélico (SALox) ou Antiaracnídeo (SAA)	Leve: aranha identificada, lesão incaracterística, ausência de comprometimento sistêmico.	-
		Moderado: independentemente da identificação do agente, lesão sugestiva ou característica, manifestações sistêmicas inespecíficas (exantema, febre), ausência de hemólise.	5 ^a
		Grave: lesão característica, manifestações clínicas e/ou evidências laboratoriais de hemólise intravascular.	10 ^a

a) recomenda-se a associação com prednisona: em adultos, 40mg/dia; e em crianças, 1mg/kg/dia, durante 5 dias

FONTE: adaptado de BRASIL, 2009.

O antiveneno específico tem maior potencial quando administrado nas primeiras horas após o envenenamento. O ideal é que o paciente receba o soro o mais breve possível, ou pelo menos até 12 horas após a picada, sendo que após 72 horas não é recomendado. Entretanto, Málaque et al. (2002) apud Pauli et al. (2003), menciona que mesmo que o soro não previna a lesão dermonecrotica, ele pode conter a extensão da lesão e limitar a ocorrência dos efeitos sistêmicos (PAULI et al., 2006).

Mesmo após os avanços de um século da soroterapia, a utilização de soros heterólogos produzidos a partir da imunização de equídeos ainda é restrita pelo temor das reações adversas que podem ocorrer. Dentre as manifestações leves provocadas pelo reconhecimento imunológico do soro estão rubor cutâneo, urticária, náuseas, vômito e crise asmatiforme, assim como reações mais graves que são representadas por arritmias cardíacas, hipotensão arterial, choque anafilático e quadro obstrutivo das vias respiratórias, apesar destas últimas serem menos frequentes. Reações tardias, como a doença do soro, também podem estar presentes. Nesse caso, os sintomas de urticária local ou generalizada, febre e artralgia aparecem de 1 a 15 dias após a administração do antiveneno. Ainda, doses complementares podem ser necessárias, aumentando o risco dessas reações (LOVRECEK e TOMIC, 2011).

Além das reações indesejáveis provocadas em humanos, em relação a produção dos soros existem dificuldades ainda quanto ao uso de grandes quantidades de veneno para a imunização, depois nos testes de potência pré-clínica, como também é relatada na literatura sofrimento dos animais que são expostos ao veneno (FIGUEIREDO et al., 2014).

Vários grupos vêm tentando contribuir com melhorias para a produção de anticorpos policlonais antiloxoscélicos. Proteínas recombinantes (ALMEIDA et al., 2008; FELICORI et al., 2006), quimera (FIGUEIREDO et al., 2014), peptídeos sintéticos (FELICORI et al., 2009; DIAS-LOPES et al., 2010; RAMADA et al., 2013) e mimotopos (DE MOURA et al., 2011) foram empregados como imunógenos alternativos ou na qualificação de anticorpos neutralizantes.

Outra possibilidade é oferecida pelo uso de anticorpos monoclonais, que podem apresentar algumas vantagens em relação aos policlonais como reprodutibilidade e especificidade, e desse modo surge como uma alternativa eficaz na terapêutica de algumas doenças (AHMAD et al., 2012; CHOW e CASADEVALL,

2012; ALVARENGA et al., 2014). Guilherme et al. (2001), produziram anticorpos monoclonais contra venenos de *L. gaucho*, porém os mesmos não foram capazes de neutralizar a atividade tóxica dos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* ou *L. laeta*. Dias Lopes et al. (2014) obteve o anticorpo monoclonal murino, mAb16, que reconhece os venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, mas apresenta inibição parcial dos efeitos tóxicos.

O anticorpo monoclonal LimAb7 produzido por Alvarenga et al. (2003) reconhece proteínas de 32 a 35 kDa, correspondendo à família Loxtox e a proteínas com atividade de esfingomielinase do veneno, as quais são consideradas como as principais indutoras da ação necrótica e hemolítica. Em 2010, o LimAb7 foi empregado por Dias-Lopes et al. (2010), para evidenciar a interação do veneno de *L. intermedia* com cardiomiócitos. De Moura et al. (2011) utilizaram a técnica de *Phage display* para mapear os epítomos reconhecidos pelo LimAb7. E mais recentemente, foi empregado no formato recombinante para detecção de veneno de *L. intermedia* em soro (JIACOMINI et al., 2016). Novas tecnologias utilizando fragmentos de anticorpos poderiam ser avaliadas como alternativa no tratamento dos acidentes com animais peçonhentos, a partir do LimAb7.

2.4 ANTICORPOS RECOMBINANTES

A partir da descoberta da penicilina, em 1930, as doenças infecciosas foram tratadas com antibióticos e a soroterapia ficou limitada para doenças virais e toxinas, os quais não possuem opções alternativas de terapêutica. Segundo Lovrecek e Tomic (2011) e Lucas (2015) a doença do soro que pode aparecer entre 1 e 15 dias após a administração do antiveneno é a reação mais comum. Como uma maneira de evitar tais questões, acredita-se que a utilização de anticorpos recombinantes seja uma solução viável para esses problemas, já que sua construção em sistemas bacterianos é capaz de sintetizar e expressar grandes quantidades de anticorpos contra vários antígenos, o que diminuiria o custo da produção e; de acordo com sua construção, evitaria o desencadeamento de respostas imunológicas indesejadas. A carga, solubilidade e estabilidade do anticorpo recombinante também podem ser alteradas de acordo com sua construção, assim como sua especificidade e reconhecimento do antígeno alvo (AHMAD et al., 2012).

Dessa forma, anticorpos recombinantes estão emergindo como uma nova classe de drogas com alto potencial para aplicações terapêuticas em oncologia, processos inflamatórios, doenças autoimunes, rejeição de transplantes, entre outros (ALVARENGA et al., 2014).

O menor fragmento funcional de anticorpo é o scFv, o qual possui cadeia leve (VL) e pesada (VH) da porção variável, unida por um *linker* de aproximadamente 15 resíduos. O *linker* deve ligar a região carboxiterminal de um domínio variável com o aminoterminal do outro sem afetar a capacidade de ligação com o antígeno. Os resíduos mais utilizados são Gly e Ser que contribuem para a flexibilidade, mas também podem ser intercalados com Glu e Lys para melhorar a solubilidade. Quando o *linker* é menor (5 resíduos) tem-se a formação de dímeros, denominados *diabody*, o qual possui tamanho como o fragmento de Fab (50 kDa) e segundo análises, esse fragmento de anticorpo possui melhor retenção em tecidos, baixa imunogenicidade, rápida distribuição e meia vida prolongada e, por causa do seu tamanho a filtração renal é inferior ao limiar. Os scFv podem ser bivalentes, monovalentes, biespecíficos (ALVARENGA et al., 2014; AHMAD et al., 2012).

Uma via comumente explorada para obtenção de scfvs é baseada no uso de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais para a obtenção das sequências de imunoglobulinas. A vantagem no uso de anticorpos monoclonais consiste na manutenção do paratopo da imunoglobulina original, consequentemente da sua especificidade e ainda, como foram demonstrados por alguns grupos, tais fragmentos conservam a mesma capacidade protetora, sendo isso imprescindível para o caso de envenenamentos (MOUSLI et al., 1999). A construção de um scFv a partir de um anticorpo monoclonal pode ser feita em um sistema de expressão bacteriana e já foi testado com eficiência também para toxinas de escorpião (AUBREY et al., 2001 e 2003).

Dependendo da construção, o anticorpo recombinante pode conter apenas as regiões variáveis leve e pesada do anticorpo unidas por um ligante peptídico (scFv); duas cadeias variáveis idênticas unidas (*Nanobodies* bivalentes ou *diabody*); scFvs biespecíficos unidos enfileirados (*tandem*); ou podem ser formadas moléculas quiméricas, como a construção *Nanobody-human Fc*, na qual a adição de uma região Fc humana a um scFv ou *nanobody* heterólogo diminui consideravelmente a chance de reconhecimento pelo sistema imune humano (FIGURA 4) (ESPINO-SOLIS et al., 2009).

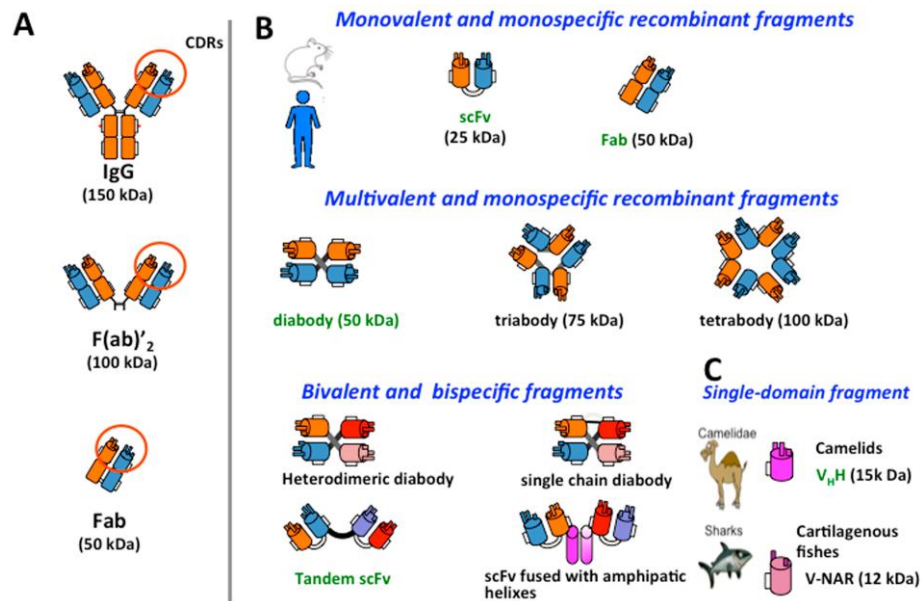


FIGURA 4: Fragmentos de anticorpos recombinantes – proteólise da molécula total do anticorpo IgG (A); formatos de fragmentos de anticorpos recombinantes, variando o tamanho (B).
 FONTE: Alvarenga et al., 2014.

Diabody são anticorpos recombinantes diméricos composto da associação não covalente de dois fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv) que se ligam ao antígeno de maneira bivalente. Possui tamanho similar ao Fab (aproximadamente 50kDa), o qual é considerado o formato mais adequado de fragmentos de anticorpos para terapia com antivenenos em termos de eficácia de neutralização e biodisponibilidade. Estrutura de cristal mostrou que o domínio VH de uma cadeia parecia com o domínio VL de outra e vice-versa (FIGURA 5) (AUBREY et al., 2003).

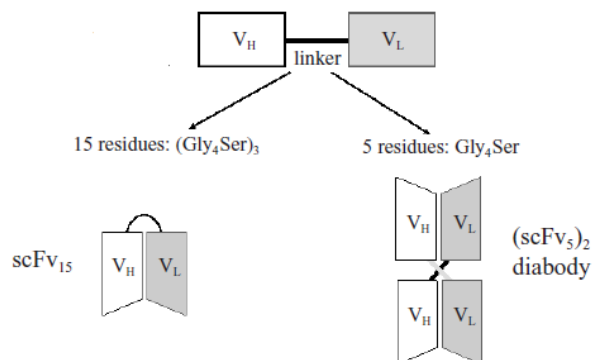


FIGURA 5: Fragmento único de cadeia variável – cadeia leve (VL) e pesada (VH) unidas por um *linker* de 15 (scFV₁₅) ou 5 (*diabody*) resíduos de aminoácido.
 FONTE: AUBREY et al., 2003.

O fragmento de anticorpo recombinante é uma molécula estável, completamente funcional e bivalente, possui alta taxa de difusão, com nível de

atividade entre 10 minutos e 6 horas. Tendo em vista a tendência no emprego de anticorpos monoclonais murinos para a obtenção de recombinantes, acreditamos no potencial do emprego do LimAb7 no formato de *diabody* recombinante para o tratamento do loxocelismo.

3 JUSTIFICATIVA

Apesar das inovações tecnológicas, a produção de soros antivenenos, realizada nos dias de hoje, obedece ao mesmo modelo básico proposto há um século, no qual animais de grande porte são imunizados com grandes quantidades de veneno a fim de induzir a produção de anticorpos específicos e neutralizantes contra as toxinas presentes (LOVRECEK e TOMIC, 2011). E, mesmo comprovada a eficácia da soroterapia, este não é um tratamento sem riscos. Já é bem relatado que a administração de anticorpos heterólogos a seres humanos pode levar a reações de hipersensibilidade devido ao reconhecimento de moléculas estranhas pelo sistema imunológico.

Neste sentido fica clara a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias na produção de anti-toxinas para uso terapêutico, que possam agregar especificidade, baixa imunogenicidade, rápida neutralização e facilidade de produção como características primordiais.

Em um estudo realizado por Alvarenga et al. (2003) foram produzidos 13 anticorpos monoclonais contra a fração dermonecrótica (DNF) do veneno de *Loxosceles intermedia*. Dentre os anticorpos obtidos, o anticorpo monoclonal LimAb7 mostrou uma alta reatividade e reconhecimento dessas proteínas, levando a neutralização total do efeito necrótico quando coelhos foram desafiados com veneno total de *L. intermedia*.

Tendo em vista a tendência do emprego de anticorpos monoclonais murinos para a obtenção de recombinantes, acreditamos no potencial do emprego LimAb7 para o tratamento do loxocelismo. Com base nisso, tal projeto foi desenhado com intuito de propor a produção de um fragmento de anticorpo recombinante a partir do LimAb7.

4 OBJETIVOS

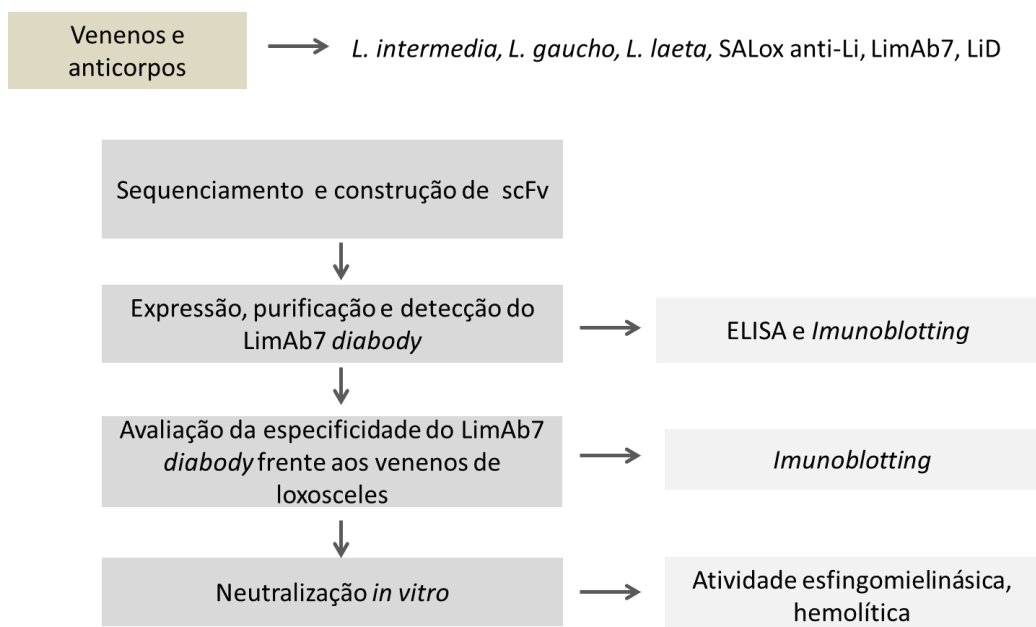
Produzir e caracterizar anticorpos recombinantes do tipo *diabody*, livres ou conjugados, dirigidos contra toxinas presentes nos venenos loxoscélicos.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sequenciar regiões codificantes das regiões variáveis de cadeia leve e pesada do LimAb7 e construir o gene recombinante.
- Clonar, expressar e caracterizar os fragmentos de anticorpos recombinantes.
- Avaliar a capacidade do *diabody* em reconhecer e neutralizar o efeito biológico de toxinas loxoscelicas em ensaios *in vitro*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



5.2 VENENOS E ANTICORPOS

Os venenos de *L. laeta*, *L. gaucho*, e *L. intermedia*, assim como o soro antiloxoscélico foram gentilmente cedidos pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI – Piraquara, PR, Brasil).

Anticorpos policlonais de cavalo, específico de *Loxosceles intermedia*, foram obtidos do soro antiloxoscélico a partir de cromatografia de afinidade usando veneno de *L. intermedia* imobilizado na coluna em Sepharose CNBr- e eluído com glicina 0,1M pH 2,8 (CHAVEZ-OLORTÉGUI et al., 1998).

Os anticorpos monoclonais murino foram purificados a partir do sobrenadante de hibridoma secretor de LimAb7 (ALVARENGA et al., 2003) por cromatografia de afinidade usando proteína A imobilizada em Sepharose CNBr- (Sigma Aldrich, Estados Unidos) nas mesmas condições descritas pela autora.

A proteína dermonecrótica recombinante, LiD1, de *L. intermedia* foi doada pelo Dr Chavez-Olortegui (UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, tendo número de acesso ao Genbank: AY340702).

Todas as amostras foram dosadas pelo método de *Bradford* (1976), aliquotadas e armazenadas em -20°C.

5.3 CONSTRUÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES

O fragmento de anticorpo recombinante selecionado para este estudo foi derivado de um hibridoma murino (LiMab7) secretor de anticorpos monoclonais do tipo IgG dirigido contra as proteínas de baixa massa molecular do veneno de *L. intermedia* (32-35 kDa) (ALVARENGA et al., 2003). A construção do anticorpo recombinante deu-se por uma estrutura dimérica a partir de duas subunidades de fragmentos variáveis de cadeia simples de anticorpos (scFv) monovalentes e designado scFv5 (LiMab7 *diabody*), em que o domínio variável da cadeia pesada (VH) está ligado com o domínio variável da cadeia leve (VL) através de um ligante flexível de 5 resíduos (Gly₄Ser). Em suma, foi realizado extração do RNAm do hibridoma LiMab7 e através da transcrição reversa foi obtido o cDNA por RT-PCR. A amplificação das cadeias variáveis deu-se com a utilização de *Taq* de alta fidelidade sendo que, para a cadeia variável pesada (VH) utilizou-se *primers* degenerados IGH-For (GAC AGT GGA TAR ACM GAT GG) e IGH-Rev (GAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG) e para a cadeia variável leve (VL) os *primers* V-KAPPA-Rev (GAT ATT GTT CTC ACC CAG TCT) e V-KAPPA-For (GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC). A amplificação da cadeia variável leve foi submetida a digestão enzimática com Bcvi afim de detectar cadeia aberrante (JUSTE et al., 2006). Após verificação da presença das cadeias por gel de agarose 2%, cada sequência foi ligada ao vetor PGEM T-easy e, esse produto de ligação foi exposto a células competentes *E. coli* TG1. Após amplificação, os plasmídeos contendo o inserto foram recuperados pela técnica de extração de DNA plasmidial (*miniprep*), purificados e dosados no espectrofotômetro (*Thermo Scientific NanoDrop 2000*). Posteriormente, foi realizada reação de sequenciamento com utilização do *big dye* e purificação do DNA para análise em sequenciador 3500XL, Applied Biosystems, Genetic Analyzer, seguindo o modelo de sequenciamento de DNA por SANGER.

Uma vez obtido a sequência, o gene sintético (Genscript, Piscataway, NJ, USA) foi desenhado de maneira a conter DNA que codificava a sequência de VH, VL fusionada por um *linker* peptídico (Gly₄Ser)₃, com dois sítios *Bam*HI e os sítios de restrição *Nco*I e *Not* (FIELDS et al., 2013; JIACOMINI et al., 2016).

5.4 EXPRESSÃO DO *DIABODY*

5.4.1 Protocolo de expressão

O inserto contendo a sequência de interesse foi removida por digestão enzimática do vetor de clonagem pUC57 e inserida em vetor de expressão pET22b (+)(Genscript, Piscataway, NJ, USA), tendo em vista que este vetor insere a sequência *PeIB*, possibilitando o direcionamento da proteína recombinante para o espaço periplásmico, e seis histidinas que contribuem para a caracterização imunoquímica e purificação da molécula de interesse. A enzima *BamHI* foi utilizada afim de diminuir o *linker* peptídico para cinco aminoácidos Gly₄Ser. O plasmídeo recombinante pET22b (+) foi inserido em bactérias *Escherichia coli* AD494pLysS (derivada de K-12), na qual mostrou melhor resultado (FIGURA 1B, ANEXO 1). Posteriormente, as bactérias foram isoladas e testadas para verificar a presença do inserto de DNA através de PCR de colônia. Ao verificar o inserto, fez-se então o pré-inóculo, no qual foram incubadas *E. coli* em meio 2XTY pH 7,4 (1,6% (w/v) triptona, 1% (w/v) extrato de levedura e 0,085 M de Cloreto de Sódio), sob agitação de 250 rpm a 37°C, 16 horas. No dia seguinte, foi realizado a amplificação a partir de 1 mL do pré-inóculo para cada 100 mL de meio 2XTY acrescido de ampicilina (50 µg/mL), sob agitação de 250 rpm, até atingir a fase exponencial de crescimento A_{600nm} alcançando entre 0,650 – 0,800. Procedeu-se à indução da expressão nestas células através da adição de 0.8 mM isopropylthiogalactoside (IPTG) sendo incubadas por mais 16 horas a 16°C (120 rpm). As células foram coletadas após centrifugação (3600 xg, 20 min, 4°C), ressuspendidas em tampão TES (0,2 M tris-HCl, pH 8.0; 0,5 mM EDTA; 0,5 M sucrose) (10 mL por litro de cultura original) por 10 minutos e, logo após, foram submetidas a um choque osmótico pela adição de TES, diluído 1:4 com H₂O (15 ml por litro de cultura original). Após incubação em gelo durante 30 minutos, a suspensão foi centrifugada (22.000 xg, 4°C, 40 min). Em seguida, as proteínas foram extensivamente dialisadas contra solução salina tamponada com fosfato (PBS) a pH 7,4 e centrifugadas a 15.000 xg, 4°C, 20 min (MUZARD et al., 2009; ZAHID et al., 2011).

Também foi realizado o protocolo de sonicação das bactérias para avaliar a presença de anticorpos no espaço citosólico e sua capacidade de reconhecimento frente ao antígeno (SPADIUT et. al, 2014). A sonicação foi realizada a partir do

sonicador (Bandelin 2070) com 10 pulsos de 1 minutos (potência de 40%) acrescentando inibidores de proteases antes o procedimento e centrifugação da amostra após, com intuito de separar as frações de proteínas solúveis e insolúveis.

5.4.2 Caracterização dos diferentes extratos protéicos contendo o *diabody*

Afim de avaliar a capacidade funcional do LimAb7 *diabody* das diferentes frações do produto de sonicação, foi realizado um gel de poliacrilamida 12,5%, SDS-PAGE, para separar as proteínas do veneno de *L. intermedia* (10 µg), usando tampão de amostra sem redução, a 150 V. O gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose 0,45 µm para realização de *Western blotting*. A transferência se faz pelo contato do gel com a membrana no interior de um uma cuba eletroforética preenchida com tampão de transferência pH 8,3 (0,192 M glicina, 0,025 M Tris, 20% de metanol absoluto (v/v) PM 32,04), que permanece no gelo 16 horas sob corrente elétrica de 24 V. Após a transferência, a membrana foi corada por *Ponceau* (1 g de *ponceau*, 50 mL de ácido acético, q.s.p. 1000ml de água destilada). Os locais de ligação não específicos foram bloqueados durante 1 hora em PBS contendo 5% (w/v) de leite seco sem gordura e 0,3% (v/v) de Tween 20 (LAEMMLI, 1970; ALVARENGA et al., 2003). Foram incubadas com o veneno as frações solúveis e insolúveis de proteínas citoplasmáticas. A reatividade foi detectada por incubação com proteína L-peroxidase (1:2000) (Sigma-Aldrich) por 16 horas em temperatura ambiente e os imunocomplexos foram corados com o substrato apropriado (diaminobenzidina (DAB) ou quimioluminescência (ECL)) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA). As demais incubações foram realizadas durante 1 hora a 37 °C e a membrana foi lavada cinco vezes com PBS, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20, entre as etapas descritas.

5.5 PURIFICAÇÃO E DETECÇÃO DO LIMab7 *DIABODY*

Os anticorpos LiMab7 *diabody* foram purificados por cromatografia de afinidade a partir do extrato periplasmático (25 mL obtido a partir de 1000 mL de cultura bacteriana), em tres estratégias. A coluna preparada com 1 mL de **proteína L** agarose (Pierce Biotechnology, Thermo Scientific) foi suavemente agitada por 16 horas à 4°C. Após lavagem com 20 mL de PBS (pH 7,4), as proteínas recombinantes foram eluídas em frações de 0,5 mL com glicina (0,1 M , pH 2,2) e

imediatamente neutralizadas com Tris 1 M (40 µL) em gelo. As frações que continham as proteínas recombinantes foram selecionados em A_{280nm} , reunidas, dialisadas contra PBS (pH 7,4), e centrifugadas (10.000 xg, a 4°C, 20 min) . Preparações de proteína foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sulfato de sódio dodecil - (SDS -PAGE) a 12,5 % e coloração com azul de Coomassie, ou por nitrato de prata, como descrito anteriormente. Segundo Muzard et al. (2009) e Rodrigo et al. (2015), a proteína L, proveniente de *Peptostreptococcus magnus*, pode ligar-se a região de *framework* da cadeia variável leve (kappa) do anticorpo sem interferir com a capacidade de ligação deste com o antígeno.

A purificação em coluna de **níquel** (Ni-NTA Sepharose, Qiagen®), assim como a de **veneno de *Loxosceles intermedia*** (Li) também foi realizada. As condições de purificação da coluna de níquel foram feitas segundo recomendações do fabricante, enquanto que para a montagem da coluna Sepharose-Li e purificação dos anticorpos, foi usada a mesma estratégia por Chavez-Olortégui et al. (1998) As duas estratégias de cromatografia empregadas seguiram o protocolo citado acima, entretanto a eluição na purificação da coluna de níquel deu-se com uma solução de contendo 150 mM de Imidazol, enquanto que na cromatografia de imunoafinidade com veneno, foi adicionada uma solução com glicina (0,1 M , pH 2,8). As preparações contendo anticorpo LiMab7 *diabody* foram dosadas pelo método de Bradford e armazenadas a -20°C até à sua utilização .

As amostras puificadas foram testadas por *Western blotting* utilizando 30 µL na preparação do gel de SDS-PAGE 12,5%, e após transferência conforme ensaio descrito no item 5.4.1, foi adicionado anti histidina-HRP ou proteína L-HRP e os imunocomplexos foram corados com o substrato apropriado (diaminobenzidina ou quimioluminescência (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA).

5.6.CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA

5.6.1.Ensaio imunoenzimático ELISA

Placas de 96 poços foram revestidas com 2,5 µg/mL de veneno de *L. intermedia* em 0,02 M de tampão de bicarbonato de sódio (pH 9,6) durante 16 horas a 4°C e depois saturou-se com caseína 2% durante 1 hora a 37°C. As placas foram então incubadas durante 1 hora com as preparações LiMab7 *diabody* a 5 µg/mL

(100 µL/poço) e em seguida durante 1 hora com proteína-L-HPR (peroxidase de rábano) (Pierce Biotechnology). A solução de substrato (orto - fenilenodiamina) foi em seguida adicionada (100 µL/poço) durante 15 minutos. A reação foi parada com 20 µL/poço de H₂SO₄ 1:20 (v/v). A absorbância avaliada a 490 nm num leitor de placas de ELISA (microplate reader 550, BIORAD). Entre cada incubação, os poços foram lavados quatro vezes com solução de lavagem (0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20). A solução de bloqueio foi usada para evitar a ligação não específica. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

5.6.2 *Imunoblotting*

5.6.2.1 *Dot blot*

Proteínas do veneno de *L. Intermedia* (2,5 µg) foram aplicadas diretamente na membrana de nitrocelulose 0,45 µm e, após bloqueio em PBS contendo 5% (w/v) de leite seco sem gordura e 0,3% (v/v) de Tween 20, incubou-se com produto da extração periplasmática (200 µL) e com LimAb7 *diabody* purificado (10 µg/mL) por diferentes ligantes de cromatografia. Todas as incubações foram realizadas por 1h/37°C e entre as etapas a membrana foi lavada 3 vezes com PBS contendo 0,5% de Tween 20. A reatividade foi detectada por incubação com proteína L-peroxidase (1:2000) (Sigma-Aldrich®) e os imunocomplexos foram corados com o substrato apropriado (diaminobenzidina ou quimioluminescência) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA).

5.6.2.2 *Western blotting*

Proteínas do veneno de *L. intermedia* (5 µg/canaleta) foram separadas por SDS-PAGE (12,5% de gel de poliacrilamida) e transferidas para membrana de nitrocelulose, conforme descrito anteriormente. Após bloqueio, a membrana foi incubada com extratos periplasmáticos (1 mL) contendo o LiMab7 *diabody*. A reatividade foi detectada por incubação com proteína L-peroxidase (1:2000) (Sigma-Aldrich) e os imunocomplexos foram corados com o substrato apropriado (diaminobenzidina ou quimioluminescência (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA)). Todas as incubações foram realizadas durante 1h a 37 °C e a membrana foi lavada cinco vezes com PBS, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20, entre as etapas descritas. IgG purificada LiMab7 foi usada como controle positivo.

5.7 NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA

A capacidade de neutralização da atividade esfingomielinásica foi observada usando o kit de ensaio de esfingomielinase Amplex® Red. Diferentes concentrações de veneno de *Loxosceles intermedia* (2,5 µg – 20 µg/mL) foram adicionados à mistura de reagentes Amplex (100 µL) e a neutralização foi realizada com 100 pmol policlonal anti - Li (cavalo), 50 pmol de LimAb7 e diferentes concentrações de LimAb7 *diabody* (25, 50, 100 pmol) . As incubações se deram por 30 minutos a 37 °C ao abrigo da luz. Em seguida foi medida a fluorescência de excitação/emissão a 550/590 nm em um fluorímetro (TECAN-RCHISTO INFINITE M200). Valores de fluorescência foram convertidos em porcentagem da atividade da esfingomielinase, utilizando o valor do veneno de *L. intermedia* (2,5 µg/mL) como 100%. A solução tampão do kit foi utilizada como controle negativo. O teste foi realizado nas mesmas condições sugeridas pelo fabricante.

5.8 NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Para avaliar a capacidade de neutralização da atividade hemolítica, foi coletado sangue humano em tubos contendo tampão citrato de sódio (BD Plastipak, Franklin Lakes) e após centrifugação a 200 xg por 15 minutos para retirada do soro as hemácias foram lavadas 3 vezes com tampão Tris Sucrose - TBS (250 mM sucrose, 10 mM Tris/HCl, pH7,4, 280 mOsm/kg H₂O). Foram incubados 10⁸ eritrócitos humanos com diferentes concentrações de veneno de *Loxosceles intermedia* (1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 µg/mL). Para avaliar o potencial de neutralização dos anticorpos, 2,5 µg/mL de veneno foi incubado com uma preparação de anticorpos (0-320 pmol). Após 24 horas a 37°C sob agitação suave, as amostras foram centrifugadas a 200 xg por 5 minutos e, o sobrenadante lido a 570 nm no espectrofotômetro, as mesmas condições foram empregadas por Chaves-Moreira et al. (2009).

Os ensaios foram feitos em triplicata, em dois experimentos individuais com controle negativo (solução TBS) e positivo (células vermelhas do sangue em água destilada e 0,1% (v/v) de Triton X-100). Os valores de absorvância foram convertidos em porcentagem de hemólise usando o valor do controle positivo (Triton X-100) como 100% de hemólise.

6 RESULTADOS

6.1 SEQUENCIAMENTO E CONSTRUÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES

O anticorpo murino LimAb7 já havia sido caracterizado por Alvarenga et al. (2003) como molécula capaz de neutralizar o veneno de *L. intermedia*. Com isso, a partir da extração de RNAm do hibridoma secretor de LimAb7 obteve-se o cDNA utilizando a técnica de RT-PCR. Foram utilizados *primers* específicos, conforme descrito por Fields et al. (2013) e citado acima, para amplificação de cadeia variável leve (VL) e pesada (VH) do anticorpo. O produto de PCR foi confirmado com o gel de agarose visualizando uma banda de aproximadamente 350 pb que corresponde VL e uma de 400 pb a VH (FIGURA 6).

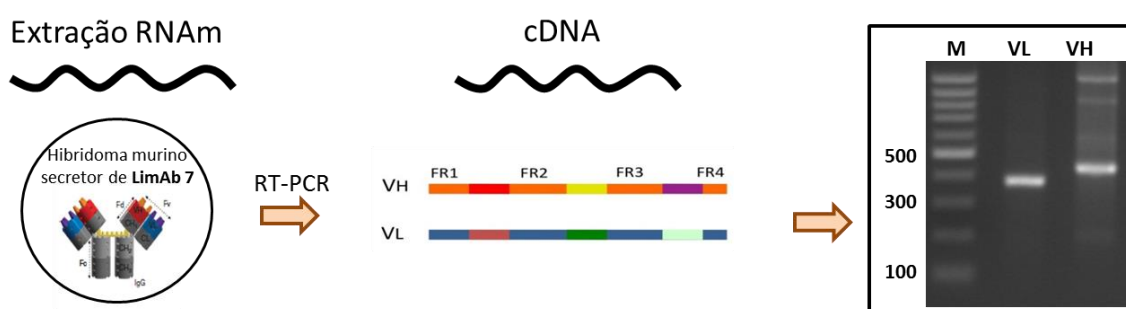


FIGURA 6: Construção de fragmentos de anticorpos recombinantes - extração de RNAm do hibridoma secretor de LimAb7 e obtenção do cDNA a partir da RT-PCR. A FIGURA à direita refere-se a amplificação de cadeia variável leve (VL) e cadeia variável pesada (VH) do anticorpo, com aproximadamente 350pb e 400pb, respectivamente.

FONTE: desenho esquemático adaptado de Fields et al., 2013.

As cadeias variáveis do anticorpo foram inseridas em vetor de clonagem, PGEM-T easy, e após amplificação em bactérias *E. coli*, cepa TG1, foi realizado reação de sequenciamento. As sequencias foram alinhadas no *software MultAlin* e para a análise de homologia e estrutura secundária (colar de pérolas) foi empregada a ferramenta interativa IGMT (FIGURA 7).

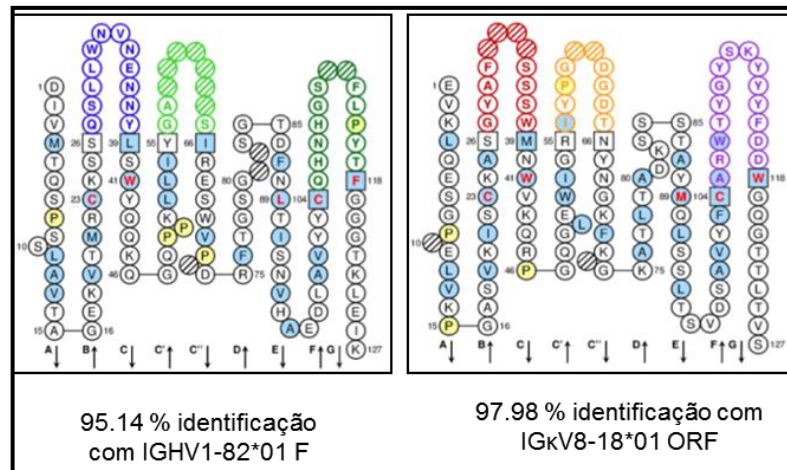


FIGURA 7: Identificação do CDR – utilizando a ferramenta interativa, tem-se o colar de pérolas e a identificação de anticorpo murino.

FONTE: http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest

A construção do fragmento deu-se pela junção de VH e VL através de um *linker* formado por 5 (scFv (Gly₄Ser)) ou 15 (scFv (Gly₄Ser)₃) resíduos de aminoácidos (JIACOMINI *et al.*, 2016). Os fragmentos formados por 5 resíduos são susceptíveis a formarem dímeros denominados LimAb7 *diabody*. Os fragmentos foram inseridos no vetor de expressão pET22b (+) o qual foi transformado em *E. coli*, cepa AD494plysS. A confirmação do inserto foi visualizado pelo produto de PCR de colônia observado em gel de agarose (FIGURA 8).

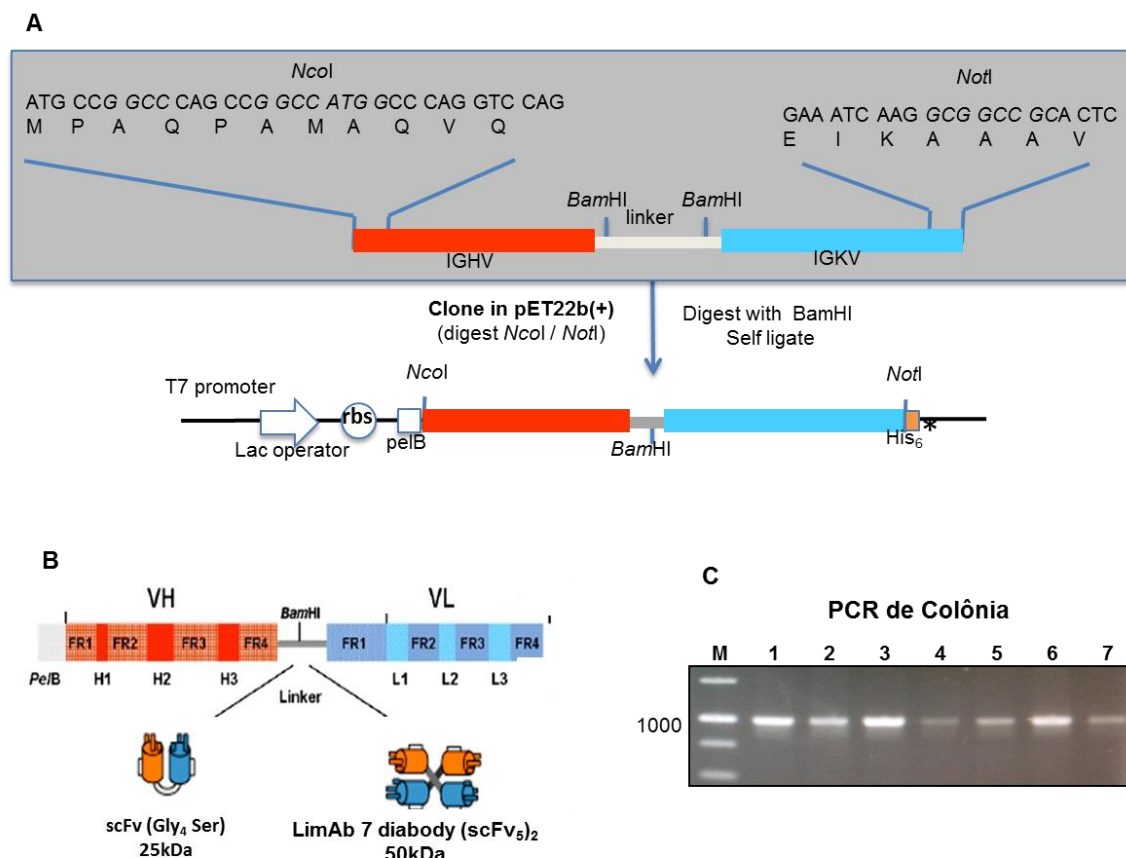


FIGURA 8: Design do gene sintético do anticorpo recombinante: A - clonagem em vetor pET22b e expressão em *E. coli* AD494plysS. B - scFv com *linker* de 5 (LimAb7 *diabody*) ou 15 resíduos de aminoácidos. C – gel de agarose 1% após PCR de colônia confirmando o inserto na bactéria de expressão AD494plysS. Números representam as colônias
 FONTE: adaptado de Muzard et al., 2009; Jacomini et al. 2016.

6.2 EXPRESSÃO PERIPLASMÁTICA, PURIFICAÇÃO E DETECÇÃO DO *DIABODY* LIMAB7

Os fragmentos de anticorpos recombinantes foram expressos em cepa de *E.coli* AD494plysS, que secreta as proteínas recombinante no espaço periplasmático, as quais foram purificados a partir de diferentes estratégias de cromatografia de afinidade, a fim de avaliar qual produziria maior rendimento. Dessa forma, após o choque osmótico para obtenção dos anticorpos e purificação obteve-se um rendimento de aproximadamente 200 µg/L de cultura bacteriana, variando conforme o ligante da coluna de purificação. A presença do fragmento de anticorpo recombinante foi confirmada por eletroforese e *western blotting* (FIGURA 1C, ANEXO 1). Para verificar a presença de monômeros ou dímeros de scFv (*diabody*) foi realizado cromatografia por exclusão de tamanho (FIGURA 2A, ANEXO 1).

Devido ao baixo rendimento, os anticorpos foram concentrados utilizando técnicas de liofilização e membrana de ultrafiltração de 10 kDa (*Vivaspin*®). Foi realizado eletroforese em gel de SDS-PAGE 12,5% com diferentes amostras de recombinantes, sendo elas purificadas ou não, e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e reveladas com proteína L ligada a HRP, a fim de confirmar a presença do LimAb7 *diabody*. Na FIGURA 9 observa a presença de uma banda de aproximadamente 25 kDa que corresponde ao monômero do scFv₅, conforme indicado pelas setas.

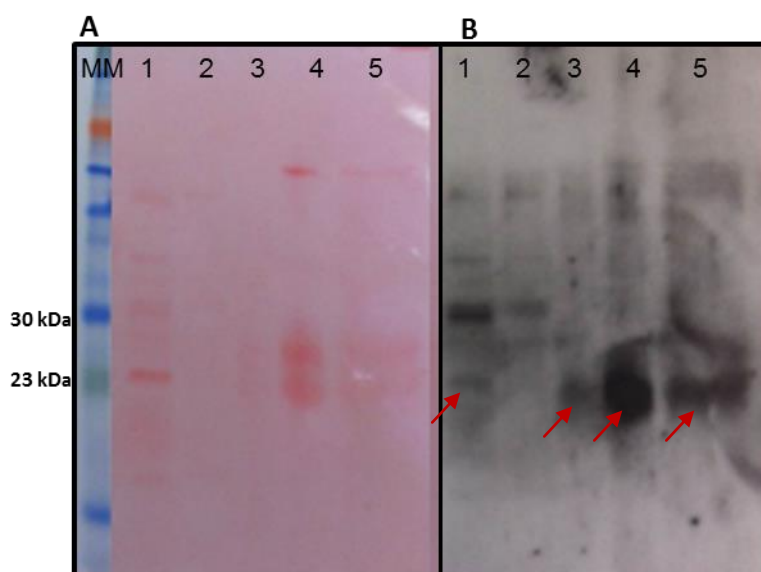


FIGURA 9: Avaliação da expressão e purificação do *diabody* - A – membrana de nitrocelulose corada por ponceau após transferência. B – *Western blotting* revelado por proteína L-HRP (1:2000), revelado por ECL após 30 minutos de exposição. Extrato periplasmático AD494 após indução com IPTG (linha 1), extrato periplasmático AD494 sem indução (linha 2), LimAb7 *diabody* purificado com coluna de proteína L (linha 3), LimAb7 *diabody* concentrado por *vivaspin*® (linha 4), LimAb7 *diabody* liofilizado (linha 5).

FONTE: a autora

Além da extração por choque osmótico foi realizado sonicação do pellet de bactérias e separação de proteínas solúveis e insolúveis com intuito de obter maior rendimento. E para avaliar se a capacidade funcional das moléculas permanecia foi realizado *western blotting*, no qual o fragmento de anticorpo foi testado frente ao antígeno. Na FIGURA 10A e B, nota-se que apenas no extrato de proteínas insolúveis não contém LimAb7 *diabody* funcional (linhas 5 e 6), sendo que essa molécula foi encontrada no citoplasma (linhas 3 e 4) e no espaço periplasmático (linhas 1 e 2), ambas mantendo sua capacidade de reconhecer proteínas presentes no veneno de *L. intermedia*. Tendo em vista, que no citoplasma tem-se uma mistura de proteínas funcionais e não funcionais foi padronizado a obtenção das proteínas

periplasmáticas por choque osmótico. Vale ressaltar que a presença da molécula de interesse sem indução ocorre devido à expressão basal.

Na FIGURA 10C, foi avaliado por *dot blotting* e ELISA, a capacidade das amostras contendo LimAb7 *diabody*, obtidas por diferentes estratégias de cromatografia, de reconhecerem o veneno de *L. intermedia*. Apesar da amostra purificada a partir de cromatografia empregando-se proteína L Sepharose ter apresentado maior reatividade, foi observado maior reprodutibilidade nas etapas de purificação quando utilizadas a cromatografia de afinidade utilizando a resina Ni-NTA agarose (dados não mostrados).

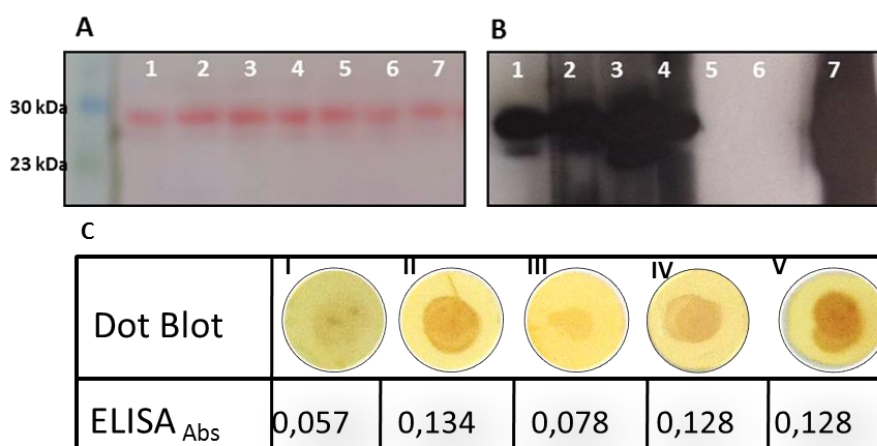


FIGURA 10: Avaliação das melhores condições de extração e purificação em relação a reatividade. **A** – membrana de nitrocelulose transferida com veneno de *L. intermedia* (Li) corada por ponceau. **B** – Western blotting para evidenciar a reatividade das diferentes amostras contendo LimAb7 *diabody* frente a 10 µg de Li. Extrato periplasmático AD494 após indução com IPTG (linha 1) e sem indução (linha 2); extrato citoplasmático solúvel AD494 após indução com IPTG (linha 3) e sem indução (linha 4); extrato citoplasmático insolúvel AD494 após indução com IPTG (linha 5) e sem indução (linha 6); controle positivo LimAb7. **C** - ELISA indireto e *dot blot* – 2,5 µg/mL de Li incubado por 1h/37 °C com: extrato periplasmático (I); LimAb7 *diabody* purificado por cromatografia de Sepharose ligada ao veneno de Li (II), níquel (III) e proteína L (IV); anti-Li cavalo-HRP (1:750) como controle positivo (V).

FONTE: a autora

6.3 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO LIMAB7 FRENTE AOS VENENOS DE *LOXOSCELES*

A técnica de *western blotting* foi utilizada para verificar o perfil de especificidade do *diabody*. Para isso, as proteínas do veneno de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* foram separadas no gel de SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com o recombinante LimAb7 *diabody*. O anticorpo LimAb7 foi utilizado como controle positivo. O mesmo padrão de

reconhecimento apresentado pelo anticorpo murino LimAb7, foi reproduzido pelo LimAb7 *diabody*. Ambos, reconhecem proteínas de *Loxosceles intermedia* na faixa de 30-35kDa descritas na literatura como toxinas dermonecrótica (FIGURA 11). A partir da técnica de ressonância plasmônica de superfície (SPR) foi mensurado a afinidade do LimAb7 *diabody* frente ao antígeno e comparado com a molécula de LimAb7 (FIGURA 3, ANEXO 1).

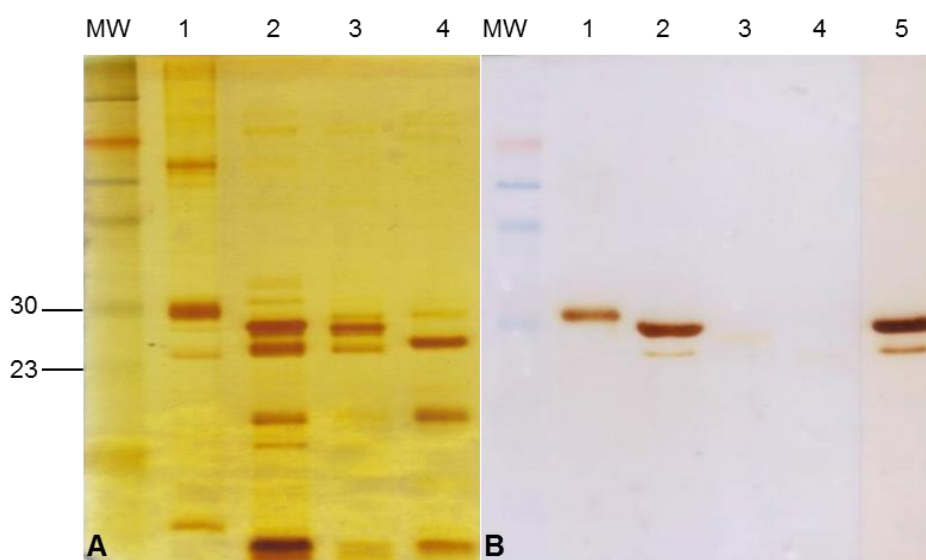


FIGURA 11: Western blotting - 10 µg de veneno (linha 1: proteína recombinante de *Loxosceles intermedia*; linhas 2 e 5: veneno total de *Loxosceles intermedia*; linha 3: veneno total de *Loxosceles gaucho*; linha 4: veneno total de *Loxosceles laeta*. A - Gel SDS –PAGE 12,5% corado por prata. B – *Western blotting*: proteínas do gel transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com: extrato periplasmático contendo LimAb7 *diabody* (linha 1-4) e LimAb7 (linha 5). Os imunocomplexos foram revelados usando anti-histidina HRP (1:500) (linha 1-4), anti-mouse HRP (1:4000) (linha 5).

FONTE: a autora

6.4 NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE ESFINGOMIELINASE

Foi realizado o ensaio *in vitro* a partir da hidrólise da esfingomielina utilizando o kit Amplex® Red para investigar a capacidade de inibição do LimAb7 *diabody*. Nota-se que a atividade esfingomielinasica (SMase) do veneno de *L. intermedia* foi inibida em mais de 90% pela adição do anticorpo recombinante, de maneira dose-dependente (FIGURA 12).

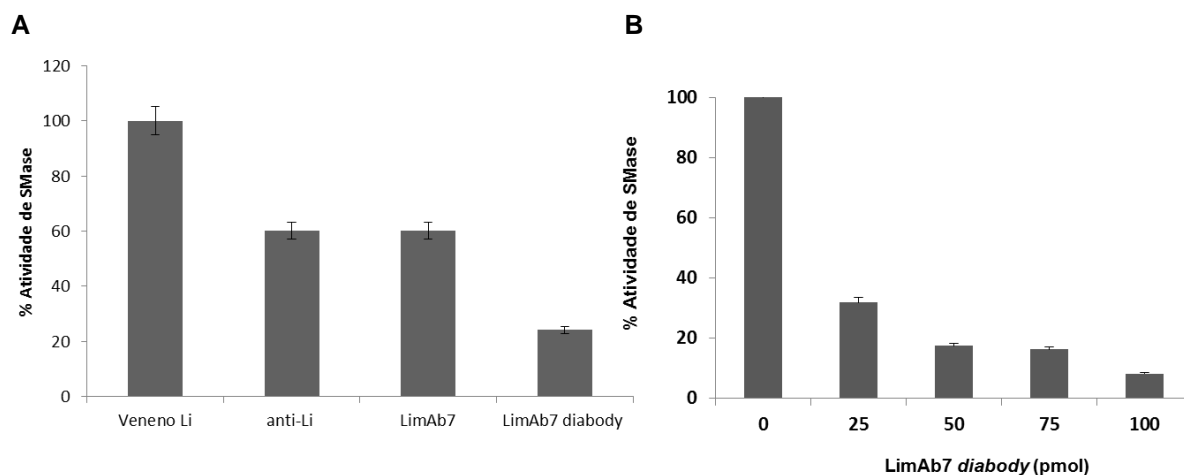


FIGURA 12: Ensaio de esfingomielinase – atividade de esfingomielinase do veneno total de *Loxosceles intermedia* (2,5 µg/mL) e potencial de neutralização do anticorpo LimAb7 *diabody* avaliado através do Kit Amplex Red. A – 50 pmol de LimAb7 e 100 pmol de anticorpos: policlonal de cavalo anti Li (anti Li) e LimAb7 *diabody*. B – neutralização da atividade de esfingomielinase do veneno frente a diferentes concentrações do anticorpo. Incubação a 37 °C por 30 minutos ao abrigo da luz. A fluorescência foi medida num leitor de microplacas utilizando excitação a 550 nm e emissão a 590 nm. FONTE: a autora

6.5 NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Segundo Chaves-Moreira et al. (2009, 2011), o veneno de aranha marrom induz hemólise independente de complemento. A FIGURA 13 mostra o potencial de neutralização dose-dependente do anticorpo LimAb7 *diabody* (diferentes concentrações 40 – 320 pmol) frente ao veneno (2,5 µg/mL de veneno de *L. intermedia*). Anticorpo LimAb7 (320 pmol) e policlonal anti *L. intermedia* de cavalo (anti-Li) (320 pmol) proveniente do soro utilizado no tratamento de acidentes loxoscélicos foram utilizados como controles para neutralização. Observa-se que 320 pmol de LimAb7 *diabody* inibe mais de 80% do efeito hemolítico do veneno, entretanto com doses menores (80 e 160 pmol) tem-se o mesmo percentual de inibição do LimAb7 e anti-Li.

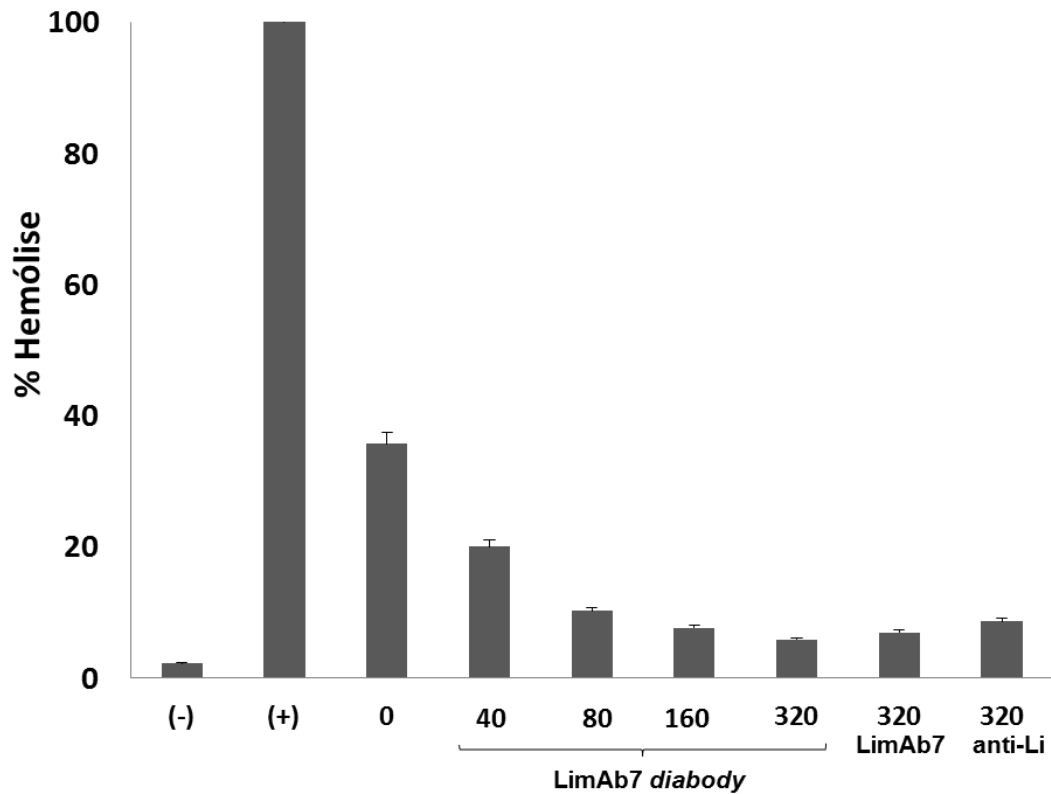


FIGURA 13: Ensaio hemolítico *in vitro* - eritrócitos humanos (10^8 células) foram incubados com 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de *Loxosceles intermedia* (Li) e diferentes concentrações do anticorpo LimAb7 *diabody* (0, 40, 80, 160, 320 pmol). Controles para neutralização: 320 pmol de LimAb7 e anticorpo policlonal de cavalo anti Li (anti Li). A porcentagem de reatividade foi determinada utilizando os valores do controle positivo (Triton X-100) como 100% de hemólise (C+). TBS foi usado como controle negativo (C-). A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm.

FONTE: a autora

7 DISCUSSÃO

De acordo com estatísticas apresentadas pelo Ministério da Saúde, o loxoscelismo ainda é considerado um problema de saúde pública. O número de casos de acidentes causados por *Loxosceles* no Paraná triplicou nos últimos 12 anos (64.668 casos notificados). Apesar do uso de dedetização e controle ambiental, pouca eficácia foi observada na redução da infestação intra e peridomiciliar das aranhas do gênero *Loxosceles* (SILVA, 2002; GREMSKI et al., 2014) .

A produção do soro antiloxoscélico ou antiaracnídico é laboriosa, pois necessita de ambiente adequado para o animal imunizado, longo período (12 meses) para a obtenção do soro além de grandes quantidades de venenos, (ALVARENGA et al., 2014; LOVRECEK e TOMIC, 2011; LUCAS, 2015). No Brasil, a demanda pelo soro antiloxoscélico é de 22.000 ampolas por ano, aproximadamente. Para isso, estima-se que são necessárias mais de 36.000 aranhas que devem produzir 1.800 mg de veneno (FIGUEIREDO et al., 2014).

Alguns autores apontam o uso de anticorpo monoclonal como futura alternativa para tratamento de loxoscelismo (ALVARENGA et al., 2003; DIAS-LOPES et al., 2014). Existem trabalhos que sugerem o uso de fragmentos de anticorpos recombinantes para envenenamento por serpentes e escorpiões (AUBREY et al., 2003; TOMMASO et al., 2012; RONCOLATO et al., 2013; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2016), porém nenhum scFv tem sido proposto como possibilidade para o tratamento do loxoscelismo.

O anticorpo monoclonal LimAb7 (ALVARENGA et al., 2003) reconhece e neutraliza a ação esfingomielinásica do veneno de *L. intermedia*. Esse anticorpo tem sido utilizado por diversos autores para fins de esclarecimento e diagnóstico do loxoscelismo (DIAS-LOPES et al., 2010; DE MOURA et al., 2011; JIACOMINI et al., 2016). Desse modo, esse trabalho sugere o uso de tecnologia recombinante para fins terapêuticos, tendo em vista a eficiência e o potencial de neutralização do *LimAb7 diabody* não demonstrado antes por nenhum outro anticorpo. Os fragmentos de anticorpos recombinantes podem ser expressos em bactérias que, são considerados o sistema mais utilizado por ter baixo custo e alta taxa de crescimento em curto intervalo de tempo (AHMAD et al., 2012; SPADIUT et al., 2014).

Nesse estudo foi isolado e clonado o gene do domínio variável de alta afinidade de IgG específica para componentes dermonecróticos do veneno de *L.*

intermedia. Esses domínios foram sintetizados de forma recombinante para gerar o $(scFv_5)_2$ afim de obter o fragmento de anticorpo capaz de neutralizar a ação do veneno. As evidências provam que a molécula manteve o mesmo efeito da IgG já caracterizada por Alvarenga et al. (2003), resultado semelhante foi obtido por Di Tommaso et al. (2012), com fragmentos de anticorpos dirigidas contra toxinas escorpiônicas. Segundo Olafsen et al. (2010), devido a baixa massa molecular dos scFv e rápida difusão no tecido, acredita-se que sejam candidatos ideais para a neutralização de substâncias tóxicas provenientes de envenenamento, já que a ligação de um scfv específico ao sítio de ligação de uma molécula tóxica inativaria seu sítio ativo, e consequentemente inibiria seu efeito deletério.

Em relação a produção dos scFv, de acordo com Spadiut et. al. (2014), as proteínas expressas no citoplasma podem não ser funcionais, pois formam corpos de inclusão. Entretanto, apesar de se obter reatividade do extrato bacteriano total frente a proteínas do veneno o mesmo não foi empregado, pois em alguns casos pode-se tratar de uma mistura de proteínas funcionais e não funcionais.

As proteínas obtidas após extração do periplasma foram concentradas por liofilização que segundo Lovreck e Tomic (2011) esse método fornece estabilidade por longos períodos de tempo em temperatura ambiente ou elevada.

Diferentes achados da literatura abordam a lise de eritrócitos, provocada pelo veneno, de maneira dependente do complemento (TAMBOURGI et al., 1998, 2000, 2005, 2007; VAN DEN BERG et al., 2002; FELICORI et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2013; MYAMOTO et al., 2016), como também de maneira independente do complemento (CHAVES-MOREIRA et al., 2009, 2011). Aqui, demonstramos que os fragmentos de anticorpos (160 pmol) foram capazes de neutralizar o efeito hemolítico direto do veneno (2,5 µg/mL), e de maneira dose dependente. Futrell e Morgan (1977), também demonstraram potencial inibidor de hemólise no entanto, empregaram antiveneno policlonal de coelho.

Di Tommaso et al. (2012), relatam que as propriedades dos anticorpos recombinantes podem influenciar na sua farmacocinética em função do tamanho (aumento da estabilidade e penetração no tecido) e que mutações sítio dirigidas ainda podem aumentar a eficiência de neutralização dessas moléculas. O LimAb7 *diabody* $(scFv_5)_2$ é maior que os $scFv_{15}$ e possui tamanho similar ao Fab, o qual é considerado o formato mais adequado em fragmentos de anticorpos para terapia,

devido a sua capacidade de penetração no tecido, biodisponibilidade e seu potencial desintoxicante.

Um número grande de fragmentos de anticorpos tem sido construído contra carboidratos, receptores, antígenos tumorais e proteínas de vírus. Os fragmentos de anticorpos têm sido utilizados em diferentes formatos de ensaios imunoenzimáticos, para o tratamento de câncer (imunotoxinas, intrabodies anticâncer), em doenças inflamatórias (Doença de Crohn's e Artrite Reumatóide), e em outras patologias (AHMAD et al., 2012). Jiacomini et al. (2016) produziu um fragmento de anticorpo recombinante scFv fusionado com fosfatase alcalina (AP) que mostrou ter sensibilidade para detectar até 39 ng/mL de veneno de *L. intermedia* adicionados em soro humano.

Estudos como o de Oliveira et al., (2009), com a neutralização de enzimas fosfolipases; e Amaro et al. (2011), com a neutralização da enzima Ts1 de *Tityus serrulatus*, mostram que anticorpos recombinantes também são capazes de neutralizar efeitos tóxicos tanto de venenos ofídicos como escorpiônicos. Mousli et al. (1999) também demonstraram o potencial do anticorpo recombinante a partir da neutralização da toxina de escorpião por *diabody*, o qual mostrou alta afinidade e estabilidade no soro, além da capacidade de proteção semelhante a situações clínicas (revisado por ALVARENGA et al., 2014).

Contudo, faz-se necessária a produção de fragmentos de anticorpos que neutralizam outras espécies prevalentes, pois segundo Chow e Casadevall (2012) e Di Tommaso et al. (2012), a combinação de múltiplos anticorpos favorece a proteção, já que a neutralização de diferentes epítomos favorece um sinergismo na proteção. Os scFv murinos podem ser considerados ainda como protótipos para o desenvolvimento de fragmentos de anticorpos humanizados. A humanização do domínio variável do *diabody* em região de *framework* de anticorpos humanos poderia melhorar a tolerância e reduzir os inconvenientes da imunogenicidade. Diversos anticorpos recombinantes humanos, murinos ou quiméricos já foram aprovados como ferramentas terapêuticas para humanos pelo órgão *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, entre eles: Trastuzumab (câncer), Palivizumab (vírus sincicial respiratório), Raxibacumab (antrax) (ESPINO-SOLIS et al., 2009; CHOW e CASADEVALL, 2012).

Ainda que estudos proponham novas terapias para o loxoscelismo, nenhuma delas é específica. Sugere-se a utilização de inibidores de metaloproteases, como

as tetraciclinas (TAMBOURGI et al., 2000, 2010; VAN DEN BERG et al., 2012; CORREA et al., 2016) como também inibidores de complemento (TAMBOURGI et al., 2010). Entretanto, o uso de fragmentos de anticorpos recombinantes dirigidos contra alvos tóxicos constituiria componentes mais específicos e efetivos na neutralização do veneno, e ainda poderiam ser empregados em conjunto com outras terapias propostas a fim de melhorar os tratamentos empregados nos dias de hoje (LOVRECEK e TOMIC, 2011).

Ainda faz-se necessário, como perspectivas desse trabalho, ensaios de neutralização de hemólise dependente de complemento, produção de fragmentos de anticorpos que neutralizam outras espécies prevalentes, combinação de múltiplos anticorpos, humanização do fragmento LimAb7 *diabody* e ensaio de neutralização *in vivo*.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, a engenharia de biomoléculas tem gerado bilhões de dólares por ano com mais de 200 proteínas recombinantes disponíveis na indústria biofarmacêutica. Fragmentos de anticorpos recombinantes representam o maior crescimento da classe desses produtos comercializados. Sendo que, essas moléculas podem ser utilizadas não apenas em aplicações terapêuticas, mas também em imunodeteção, purificação e aplicações de bioseparação. Outra vantagem do uso de fragmentos de anticorpos é atribuída ao aumento da taxa de penetração nos tecidos e o baixo tempo de retenção, comparados com a molécula inteira (SPADIUT et. al, 2014).

Os resultados apresentados nessa dissertação suportam a hipótese do uso de fragmentos de anticorpos recombinantes para terapêutica de envenenamentos conforme estudado por Tommaso et al. (2012) e Roncolato et al. (2013). Visto que, o fragmento de anticorpo recombinante (scFv₅)₂, LimAb7 *diabody*, tem potencial para ser utilizado no tratamento de acidentes por *Loxosceles intermedia*, pois reconhece o veneno e diminui a ação esfingomielinásica do mesmo. Em ensaio *in vitro* com eritrócitos humano foi demonstrado uma importante ação neutralizante. Sendo assim, os resultados obtidos com o LimAb7 *diabody* são uma motivação para produção de outros fragmentos frente a proteínas das principais espécies de *Loxosceles* do Brasil, bem como a produção de anticorpos humanizados para possível uso terapêutico. Além disso, foi o primeiro trabalho a descrever a produção e caracterização de um fragmento de anticorpo recombinante que reconhece e neutraliza proteínas tóxicas do veneno de *Loxosceles intermedia*.

REFERÊNCIAS

- AHMAD Z.A., YEAP S.K., ALI A.M., HO W.Y., ALITHEEN N.B.M., HAMID M.. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1-15, 2012
- ALMEIDA D.M., FERNANDES-PEDROSA M.F., ANDRADE R.M.G., MARCELINO J.R., GONDO-HIGASHI H., AZEVEDO I.L.M.J., HO P.L., VAN DEN BERG C., TAMBOURGI D.V.. A New Anti-loxoscelic Serum Produced Against Recombinant Sphingomyelinase D: Results of Preclinical Trials. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 79, p. 463–470, 2008.
- ALVARENGA et al.. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. **Toxicon**, v. 42, p. 725-731, 2003.
- ALVARENGA L.M., ZAHID M., TOMMASO A., JUSTE M. O., AUBREY N., BILLIALD P., MUZARD J.. Engineering venom's toxin-neutralizing antibody fragments and its therapeutic potential. **Toxins**, v. 6,p. 2541-2567. 2014
- AMARO, I.; RIAÑO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Isolation and characterization of a human antibody fragment specific for Ts1 toxin from Tityus serrulatus scorpion. **ImmunolLett**, v. 139, p. 73-79, 2011.
- AUBREY N, DEVAUX C, DI LUCCIO E, GOYFFON M, ROCHAT H, BILLIALD P. A recombinant scFv/streptavidin-binding peptide fusion protein for the quantitative determination of the scorpion venom neurotoxin **Aahl.Biol Chem.**, v. 382, p. 1621-1628, nov. 2001.
- AUBREY N, DEVAUX C, SIZARET PY, ROCHAT H, GOYFFON M, BILLIALD P. Design and evaluation of a *diabody* to improve protection against a potent scorpion neurotoxin. **Cell Mol Life Sci.**, v. 60, p. 617-628, mar. 2003.
- BRASIL – Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ª ed. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. Disponível em < ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/manu_peco01.pdf > acessado em 3 de agosto de 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância epidemiológica**. 7ª edição. Brasília/DF. 2009. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf>. Acesso em: 2 setembro. 2013.
- BRAZ A., MINOZZO J., ABREU J.C., GUBERT I.C., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI. Development and evaluation of the neutralizing capacity of horse antivenom against the Brazilian spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v. 37, p. 1323-1328, 2008.
- CABRERIZO S., DOCAMPO P.C., CARI C., ROZAS M.O., DIAZ M., ROODT A.R., CURCI O.. Loxoscelismo: epidemiología y clínica de una patología endémica en el país. **Arch Argent Pediatr**, v. 107, p. 152-159, mar. 2009

CHAGAS F.B, et al... Aspectos epidemiológicos dos acidentes por aranhas no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Evidência**, Joaçaba v.10 n1-2, p121-130, jan/dez 2010.

CHAIM O.M., SADE Y.B., da SILVEIRA R.B., TOMA L., KALAPOTHAKIS E., CHAVEZ-OLORTEGUI C., MANGILI O.C., GREMSKI W., VON DIETRICH C.P., NADER H.B., VEIGA S.S.. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, p. 64–77, fev. 2006.

CHAVES-MOREIRA D., CHAIM O.M., SADE Y.B., PALUDO K.S., GREMSKI L.H., DONATTI L., MOURA J., MANGILI O.C., GREMSKI W., SILVEIRA R.B., SENFF-RIBEIRO A., VEIGA S.S.. Identification of a Direct Hemolytic Effect Dependent on the Catalytic Activity Induced by Phospholipase-D (Dermonecrotic Toxin) From Brown Spider Venom. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 107, p. 655–666, 2009.

CHAVES-MOREIRA D., SOUZA F.N., FOGAÇA R.T., MANGILI O.C., GREMSKI W., SENFF-RIBEIRO A., CHAIM O.M., VEIGA S.S.. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. **J Cell Biochem.**, v. 112, p. 2529-2540, set. 2011.

CHOW S.K., CASADEVALL A.. Monoclonal Antibodies and Toxins—A Perspective on Function and Isotype. **Toxins**, v. 4, p. 430-454, 2012.

CORRÊA M.A., OKAMOTO C.K., GONÇALVES-DE-ANDRADE R.M., VAN-DEN-BERG C.W., TAMBOURGI D.V.. Sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* Venom Induces the Expression of MMP7 in Human Keratinocytes: Contribution to Dermonecrosis. **Plos one**, v. 11, p. 1-39, abr., 2016.

DE MOURA, J., FELICORI, L., MOREAU, V., GUIMARÃES, G., DIAS-LOPES, C., MOLINA, L., ALVARENGA, L.M., FERNANDES, P., FRÉZARD, F., RIBEIRO, R.R., FLEURY, C., NGUYEN, C., MOLINA, F., GRANIER, C., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.. Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. **Vaccine**, v. 29, p. 7992–8001, 2011.

DI TOMMASO A., JUSTE M.O., MARTIN-EAUCLAIRE M.F., DIMIER-POISSON I., BILLIALD P., AUBREY N.. *Diabody* Mixture Providing Full Protection against Experimental Scorpion Envenoming with Crude *Androctonus australis* Venom. **The journal of biological chemistry**, v. 287, p. 14149–14156, abr. 2012.

DIAS-LOPES C., GUIMARÃES G., FELICORI L., FERNANDES P., EMERY L., KALAPOTHAKIS E., NGUYEN C., MOLINA F., GRANIER C., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C.. A protective immune response against lethal, dermonecrotic and hemorrhagic effects of *Loxosceles intermedia* venom elicited by a 27-residue peptide. **Toxicon**, v. 55, p. 481-487, 2010

DIAS-LOPES C., FELICORI L., RUBRECHT L., COBO S., MOLINA L., NGUYEN C., GALÉA P., GRANIER C., MOLINA F., CHÁVEZ-OLORTEGUI C.. Generation and

molecular characterization of a monoclonal antibody reactive with conserved epitope in sphingomyelinases D from *Loxosceles* spider venoms. **Vaccine**, v. 32, p. 2086–2092, 2014.

DUARTE C.G., BONILLA C., GUIMARÃES C., MACHADO DE AVILA R.A., MENDES T.M., SILVA W., TINTAYA B., YARLEQUE A., CHAVEZ-OLORTEGUI C.. Anti-loxoscelic horse serum produced against a recombinant dermonecrotic protein of Brazilian *Loxosceles intermedia* spider neutralize lethal effects of *Loxosceles laeta* venom from Peru. **Toxicon**, v. 93, p. 37-40, 2015.

ESPINO-SOLIS G.P., RIAÑO-UMBARILA L., BECERRIL B., POSSANI L.D.. Antidotes against venomous animals: State of the art and perspectives. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 183-199, mar. 2009.

FELICORI L., ARAUJO S.C., MACHADE DE ÁVILA R.A., SANCHEZ E.F., GRANIER C., KALAPOTHAKIS E., CHAVEZ-OLORTEGUI C.. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. **Toxicon**, v. 48, p. 509-519, out. 2006.

FELICORI L., FERNANDES P., GIUSTA M., DUARTE C., KALAPOTHAKIS E., NGUYEN C., MOLINA F., GRANIER C., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. **Vaccine**, v. 27, p. 4201-4208, 2009.

FIELDS C., O'CONNELL D., XIAO S., LEE G.U., BILLIALD P., MUZARD J.. Creation of recombinant antigen-binding molecules derived from hybridomas secreting specific antibodies. **Nature protocols**, v. 8, p. 1125-1148, 2013

FIGUEIREDO L.F.M., DIAS-LOPES C., ALVARENGA L.M., MENDES T.M., MACHADO-DE-AVILA R.A., MCCORMACK J., MINOZZO J.C., KALAPOTHAKIS E., CHAVEZ-OLORTEGUI C.. Innovative immunization protocols using chimeric recombinant protein for the production of polyspecific loxoscelic antivenom in horses. **Toxicon**, v. 86, p. 59-67, 2014.

FUTRELL J.M., MORGAN P.N.. Identification and Neutralization of Biological Activities Associated with Venom from the Brown Recluse Spider, *Loxosceles reclusa*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 26, p. 1206-1211, nov. 1977.

GUILHERME, P.; FERNANDES, I.; BARBARO, K. C.. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 39, p. 1333-1342, 2001.

GOMEZ H.F., KRYWKO D.M., STOECKER W.V.. A New Assay for the Detection of *Loxosceles* Species (Brown Recluse) Spider Venom. **Annals of emergency medicine**, v. 39, p. 469-474, mai. 2002.

GREMSKI L.H., TREVISAN-SILVA D., FERRER V.P., MATSUBARA F.H., MEISSNER G.O., WILLE A.C.M., VUITIKA L., DIAS-LOPES C., ULLAH A., MORAES

F.R., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C., BARBARO K.C., MURAKAMI., ARNI R.K., SENFF-RIBEIRO A., CHAIM O.M., VEIGA S.S.. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, v. 83, p. 91-120, 2014.

JIACOMINI I., SILVA S.K., AUBREY N., MUZARD J., CHAVEZ-OLORTEGUI C., DE MOURA J., BILLIALD P., ALVARENGA L.M.. Immunodetection of the “brown” spider (*Loxosceles intermedia*) dermonecrotxin with an scFv-alkaline phosphatase fusion protein. **Immunology Letters**, v. 173, p. 1-6, 2016.

JUSTE M., MUZARD J., BILLIALD P.. Cloning of the antibody ! light chain V-gene from murine hybridomas by bypassing the aberrant MOPC21-derived transcript. **Anal Biochem**, v.349, p. 159-161, fev. 2006.

KALAPOTHAKIS, E; ARAUJO, S. C.; DECASTRO, C. S.; MENDES, T. M.; GOMEZ, M. V.; MANGILI, O. C.; GUBERT, I. C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon** (Oxford), Inglaterra, v. 40, p. 1691-1699, 2002.

KRYWKO D.M., GOMEZ H.F.. Detection of *Loxosceles* Species Venom in Dermal Lesions: A Comparison of 4 Venom Recovery Methods. **Annals of emergency medicine**, v. 39, p. 475-480, mai. 2002.

KUSMA J., CHAIM O.M., WILLE A.C.M., FERRER V.P., SADE Y.B., DONATTI L., GREMSKI W., MANGILI O.C., VEIGA S.S.. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, v. 90, p. 1722-1736, nov/dez. 2008.

LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LOVRECEK D., TOMIC S., A Century of a Antivenom. **Coll. Antropol.**, v. 35, p. 249–258, 2011.

LUCAS S.M.. The history of venomous spider identification, venom extraction methods and antivenom production: a long journey at the Butantan Institute, São Paulo, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, p. 1-3, 2015

MACHADO L.F, LAUGESSEN S., BOTELHO E.D., RICART C.A., FONTES W., BARBARO K.C., ROEPSTORFF P., SOUSA M.V.. Proteome analysis of brown spider venom: Identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, v. 5, p.2167-2176, 2005.

MARTINS F.J. et al... Perfil dos acidentes causados por aranhas na área de abrangência sanitária do município de Juiz de Fora – MG. **Rev APS**, v. 14, p. 303-312, jul/set. 2011.

MARTIN G.J., PETER J.W.M.. Clinical trials of antibody therapy. **Immunology Today**, v. 21, p. 403-410, agos. 2000.

MARQUES-DA-SILVA E; FISCHER M.L.. Distribuição da espécie do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 331-335, jul/ago. 2005.

McGLASSON D.L., GREEN J.A., STOECKER W.V., BABCOCK J.L., CALCARA D.A.. Duration of *Loxosceles* reclusa Venom Detection by ELISA from Swabs. **Clin Lab Sci**, v. 22, p. 216-22, 2009.

MOREIRA, D C. **Estudo da atividade hemolítica do veneno de *Loxosceles intermedia* (aranha marrom) e seus mecanismos moleculares**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

MOUSLI M, DEVAUX C, ROCHAT H, GOYFFON M, BILLIALD P. A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*..**FEBS Lett**, v.442, p.183-188, Jan. 1999.

MURAKAMI, M.T., FERNANDES-PEDROSA, M.F., TAMBOURGI, D.V., Arni, R.K.. Structural basis for metal-ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. **J. Biol. Chem**, v. 280, p. 13658–13664, 2005.

MUZARD J., ADI-BESSALEM S., JUSTE M., LARABA-DJEBARI F., AUBREY N., BILLIALD P.. Grafting of protein L-binding activity onto recombinant antibody fragments. **Analytical Biochemistry**, v. 388, p. 331-338, 2009.

MYAMOTO D.T., PIDDE-QUEIROZ G., GONÇALVES-DE-ANDRADE R.M., PEDROSO A., VAN DEN BERG C.W., TAMBOURGI D.V.. Characterization of a Gene Coding for the Complement System Component FB from *Loxosceles* laeta Spider Venom Glands. **PLoS One**, v. 11, p. 1-40, 2016.

OKAMOTO C.K.. **Análise do papel do sistema complemento na injúria a células renais causada pelo veneno da aranha *Loxosceles***. Tese de doutorado. USP. São Paulo, 2012. Disponível em < www.teses.usp.br/teses/.../CinthyaKimoriOkamoto_Doutorado_P.pdf>. Acessado em 05 de agosto de 2013.

OLAFSEN T., SIRK S.J., BETTING D.J., KENANOVA V.E., BAUER K.B., LADNO W., RAUBITSCHKE A.A., TIMMEMAN J.M., WU A.M.. ImmunoPET imaging of B-cell lymphoma using ¹²⁴I-anti-CD20 scFv dimers (diabodies). **Protein Eng Des Sel.**, v. 23, p. 243-249, abr. 2010.

OLIVEIRA C.Z.. Caracterização funcional e estrutural de inibidores de fosfolipases A2 isolados do plasma de serpente *Bothrops jararacussu*. 2009. **Tese de Doutorado** - Universidade de São Paulo (USP). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto Ribeirão Preto.

PAULI I, GGUBERT I, MINOZZO J. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, v. 48, p. 123-137, 2006.

PINTO L. R. **Loxoscelismo em Curitiba/PR: uma abordagem geográfica**. 147fls. Dissertação de Mestrado - Setor de Ciência da Terra, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

RAMADA J.S., BECKER-FINCO A., MINOZZO J.C., FELICORI L.F., MACHADO DE AVILA R.A., MOLINA F., NGUYEN C., DE MOURA J., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C., ALVARENGA L.M.. Synthetic peptides for in vitro evaluation of the neutralizing potency of *Loxosceles* antivenoms. **Toxicon**, v. 73, p. 47-55, 2013.

RIBEIRO R.O.S. **Análise comparativa estrutural e das propriedades biológicas das toxinas dermonecróticas recombinantes LirRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 do veneno da aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*)**. Dissertação de Mestrado – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RIVERA I-O, ORDOÑEZ M., PRESA N., GOMEZ-LARRAURI A., SIMÓN J., TRUEBA M., GOMEZ-MUNÓZ. Sphingomyelinase D/Ceramide 1-Phosphate in Cell Survival and Inflammation. **Toxins**, v. 7, p. 1457-1466, 2015.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ E.R., OLAMENDI-PORTUGAL T., SERRANO-POSADA H., ARREDONDO-LÓPEZ JN., GÓMEZ-RAMÍREZ I., FERNÁNDEZ-TABOADA G., POSSANI LD., ANGUIANO-VEGA GA., RIAÑO-UMBARILA L., BECERRIL B.. Broadening the neutralizing capacity of a family of antibody fragments against different toxins from Mexican scorpions. **Toxicon**, v. 119, p. 52-63, mai. 2016.

RODRIGO G., GRUVEGÅRD M., ALSTINE J.M.V.. Antibody fragments and their purification by protein L affinity chromatography. **Antibodies**, v. 4, p. 259-277, 2015.

RONCOLATO, E.C.; PUCCA, M.B.; FUNAYAMA, J.C.; BERTOLINI, T.B.; CAMPOS, L.B.; BARBOSA, J.E.. Human antibody fragments specific for *Bothrops jararacussu* venom reduce the toxicity of other *Bothrops* sp. venoms. *J. Immunotoxicol.* 2013, 10, 160–168.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular Cloning: **a Laboratory Manual** 3rd edn. (eds. Sambrook J, Russell, DW) 11.98–11.133 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

SILVA E.M. **Loxoscelismo no Estado do Paraná: análise epidemiológica dos acidentes causados por *Loxosceles Heineken* & Lowe, 1832, no período de 1993 a 2000**. Dissertação de mestrado. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2002. Disponível em <
http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/zoonoses_intoxicacoes/anim_pec/Loxoscelismo_no_Pr.pdf> Acessado em 5 de agosto de 2013.

SPADIUT O., CAPONE S., KRAINER F., GLIEDER A., HERWIG C.. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. **Trends in Biotechnology**, v. 32, p. 54-60, jan. 2014.

TAMBOURGI D.V., MAGNOLI F.C., VAN DEN BERG C.W., MORGAN B.P., DE ARAUJO P.S., ALVES E.W., DA SILVA W.D. . Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 251, p. 366-373, out. 1998.

TAMBOURGI D.V., MORGAN B.P., de ANDRADE R.M.G., MAGNOLI F.C., Van Den BERG C.W.. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **BLOOD**, v.95, p. 683-691, jan. 2000.

TAMBOURGI D.V., PAIXÃO-CAVALCANTE D., GONÇALVES DE ANDRADE R.M., FERNANDES-PEDROSA M.DE F., MAGNOLI F.C., PAUL MORGAN B., VAN DEN BERG C.W.. *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. **J Invest Dermatol.**, v.124, p. 725-731, abr. 2005.

TAMBOURGI D.V., FERNANDES PEDROSA M.F., GONÇALVES DE ANDRADE R.M., BILLINGTON S.J., GRIFFITHS M., VAN DEN BERG C.W.. Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 576–582, jan. 2007.

TAMBOURGI D.V., GONÇALVES-DE-ANDRADE R.M., VAN DEN BERG C.W.. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon**, v. 56, p. 1113–1119, 2010.

VAN DEN BERG C.W., GONCALVES DE ANDRADE R.M., MAGNOLI F.C., MARCHBANK K.J., TAMBOURGI D.V.. *Loxosceles* spider venom induces metalloproteinase mediated cleavage of MCP/CD46 and MHCI and induces protection against C-mediated lysis. **Immunology**, v. 107, p. 102-110, 2002.

VAN DEN BERG C.W., GONÇALVES-DE-ANDRADE R.M., OKAMOTO C.K., TAMBOURGI D.. C5a receptor is cleaved by metalloproteases induced by sphingomyelinase D from *Loxosceles* spider venom. **Immunobiology**, v. 217, p. 935-941, 2012.

WASSERMAN G.S., CALCARA D.A., GREEN J.A., STOECKER W.V., LARKIN K.. Systemic Loxoscelism Confirmation by Bite-Site Skin Surface ELISA: This case illustrates the most common symptomatic effect in systemic loxoscelismhemolytic anemia. **Missouri medicine**, v. 106, p. 425-431, nov/dez 2009.

ZAHID M., LOYAU S., BOUABDELLI M., AUBREY N., JANDROT-PERRUS M., BILLIALD P.. Design and reshaping of an scFv directed against human platelet glycoprotein VI with diagnostic potential. **Analytical Biochemistry**, v. 417, p. 274–282, 2011.

ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO

Immunology Letters 176 (2016) 90–96



Contents lists available at ScienceDirect

Immunology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/immllet

Generation of recombinant antibody fragments with toxin-neutralizing potential in loxoscelism



Sabrina Karim-Silva^a, Juliana de Moura^a, Magali Noiray^b, Joao Carlos Minozzo^c,
Nicolas Aubrey^d, Larissa M. Alvarenga^{a,e,*}, Philippe Billiald^{b,e,*}

^a Universidade Federal do Parana, Departamento de Patologia Basica, Laboratorio de Imunoquimica, Curitiba, PR, Brazil

^b University Paris-Sud, School of Pharmacy, UMS IPSIT, 5 rue J.-B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

^c Centro de Producao e Pesquisa de Imunobiologicos – CPPI, Piraquara, PR, Brazil

^d Université de Tours – INRA, UMR 1282, Faculté de Pharmacie, 31 Avenue Monge, 37200 Tours Cedex, France

^e Muséum National d'Histoire Naturelle et Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7245, 57 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 March 2016

Received in revised form 3 May 2016

Accepted 17 May 2016

Available online 7 June 2016

Keywords:

Loxosceles

Venom

Diabody

Neutralization

Spider

Antivenom

ABSTRACT

Loxosceles spider bites often lead to serious envenomings and no definite therapy has yet been established. In such a context, it is of interest to consider an antibody-based targeted therapy. We have previously prepared a murine monoclonal IgG (LiMab7) that binds to 32–35 kDa components of *Loxosceles intermedia* venom and neutralizes the dermonecrotic activity of the venom. Here, we re-engineered LiMab7 into a recombinant diabody. The protein was produced in bacteria and then it was functionally characterized. It proved to be efficient at neutralizing sphingomyelinase and hemolytic activities of the crude venom despite the slightly altered binding kinetic constants and the limited stability of the dimeric configuration. This is the first report of a specific recombinant antibody for a next-generation of *Loxosceles* antivenoms.

© 2016 European Federation of Immunological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Loxoscelism is a necrotizing-hemolytic syndrome considered as the most important form of arachnidism in South America. In Brazil, *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles laeta* and *Loxosceles intermedia* are the prominent species while *Loxosceles hirsuta* is another emerging species of which the venom has not yet been well-characterized [1,2]. Several thousands of bites have been reported annually with significant morbidity and mortality mainly observed among pediatric populations or in older patients with altered renal function. Typically, oedema and ischemia are observed at the bite site within few hours, followed by eschar within days and occasionally extended necrotic areas over weeks. More severe systemic response is observed in some patients causing hemolysis and rhabdomyolysis with subsequent anemia and renal failure.

Loxosceles venom consists of bioactive molecules including numerous enzymes. Key components are 32–35 kDa sphingomyelinases D (SMaseD) which activate platelets aggregation, complement-dependent hemolysis and neutrophil recruitment. The spreading of toxins through the tissue is also facilitated by hyaluronidase that is present in the venom.

No definitive therapy as yet been established for the treatment of Loxoscelism [3]. In Brazil, serum therapy has been used clinically since the early 1960s. Some companies distribute antivenoms consisting of equine polyclonal antibody fragments, mostly F(ab)₂, raised against the venom. They have a great efficiency if given soon after the bite [4]. More recently, treatment of experimentally envenomed animals demonstrated that conventional antivenoms could advantageously be substituted for anti SMaseD antibodies [5].

However, even if the potential of serum therapy is now well established, polyclonal preparations remain not chemically well-defined heterologous reagents, exhibit high batch to batch variability and differ over the time by source of origin [6].

In recent decades molecular engineering methods have seen impressive advances enabling the design of recombinant antibodies and derivatives that now represent the fastest growing class of biopharmaceuticals used to treat a variety of human diseases. In

Abbreviation: scFv, single-chain antibody fragment.

* Corresponding authors at: Muséum National d'Histoire Naturelle et Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7245, 57 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France.

E-mail addresses: lmalvarenga@ufpr.br (L.M. Alvarenga), philippe.billiald@u-psud.fr, billiald@mnhn.fr (P. Billiald).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imllet.2016.05.019>

0165-2478/© 2016 European Federation of Immunological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

this context, the cost of pharmaceutical development has dramatically decreased making possible to consider the rise of recombinant antibodies for the treatment of orphan and rare diseases [7]. In the mean time, a large number of early preclinical studies have clearly demonstrated the potential of anti-toxins recombinant antibody fragments for a “targeted” therapy toward the treatment of envenomings, with improved efficacy and safety [8–10].

Hybridoma LimAb7 secretes a well-characterized murine IgG directed against SMaseD isoforms that are mainly responsible for the toxicity of *L. intermedia* venom. Until now, this antibody is the only one reported with the ability to neutralize the dermonecrotic effects of *L. intermedia* venom when injected in animal models [11]. Due to these features, LimAb7 represents a useful source for the design of recombinant therapeutic antibody fragments.

This report describes the engineering of scFvs derived from LimAb7. They were produced by recombinant bacteria, in a soluble and active form, and retained, *in vitro*, the capacity to neutralize the venom of *L. intermedia*. These scFvs can be considered as building blocks to design humanized antibody fragments with improved characteristics for therapeutic applications. In this way, they constitute the first step towards a new generation of antivenoms.

2. Material and methods

2.1. Materials

LimAb7 is a murine monoclonal IgG₁, kappa chain antibody directed against related 32–35 kDa SMaseD of *Loxosceles intermedia* venom. LimAb7 neutralizes the dermonecrotic activity of the *L. intermedia* venom and doesn't cross-react with *L. laeta* nor *L. gaucho* venoms [11].

Specific horse polyclonal antibodies to *L. intermedia* venom were prepared as previously reported [11].

Vacuum dried venoms from *L. laeta*, *L. gaucho*, and *L. intermedia* spiders were provided by the Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI, Piraquara, PR, Brazil) and resuspended in a 10 mM Na₂HPO₄ buffer containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl (PBS), pH 7.4 at a concentration of 0.8–1 mg/mL.

The recombinant dermonecrotic protein rLiD1 (SMaseD) from *L. intermedia* was a gift from Dr Chavez-Olortegui (UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil) (Genbank accession number: AY340702).

Escherichia coli strains used for protein expression were BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, AD494pLysS, Origami, the last two being optimized for disulfide bond formation in the cytoplasm (Novagen, Nottingham, UK).

Culture media were from AthenaES (Baltimore, MD, USA) and all chemicals were of standard grade from Sigma (Saint-Louis, MO, USA) or equivalent.

3. Methods

3.1. Construction of single-chain antibody fragment genes

cDNAs encoding the antibody variable domains were cloned after RT-PCR as previously reported [12]. A gene encoding scFv₁₅Li7 with codons optimized for expression in *Escherichia coli* was synthesized and cloned into the prokaryotic expression vector pET22b(+) (Genscript, Piscataway, NJ, USA). This gene encodes scFv₁₅Li7 consisting of LimAb7 IGHV domain fused to the IG-KappaV domain via the (Gly₄Ser)₃ short flexible domain (GenBank accession number KT381972). Two *Bam*HI restriction sites were introduced in the nucleotide sequence encoding the (Gly₄Ser)₃ linker. In this way, double digestion with *Bam*HI followed by self-ligation of the plasmid allowed to generate a vector encoding scFv₁₅Li7 (Fig. 1).

Molecular biology was carried out as in [13].

3.2. Expression of scFvs

Bacteria were grown under agitation (250 rpm, 37 °C) in 400 mL culture medium containing ampicillin (50 µg/mL) until A_{600nm} reached 0.8. The promoter was then induced with IPTG (0.8 mM) for 3 h at 26 °C (120 rpm). The cells were pelleted (3600g, 20 min, 4 °C) and the supernatant was saved. Periplasmic extracts were collected after mild osmotic shock as in [13]. Soluble cytoplasmic proteins were also recovered after sonication. All soluble protein extracts were extensively dialyzed against PBS at pH 7.4 and clarified by centrifuging (15,000g, 4 °C, 20 min).

3.3. LimAb7 scFvs purification and detection

Purification of (His)₆ tagged proteins was carried out using IMAC-chromatography. Periplasmic extract (30 mL) was passed through a microcolumn containing 500 µL of Ni²⁺-NTA-Agarose beads (Qiagen, Les Ulis, France). After washing with PBS, pH 7.4 containing 20 mM imidazole bound proteins were eluted with the same buffer containing 150 mM imidazole, in 0.5 mL fractions. Fractions with A_{280nm} higher than 0.1 were pooled and extensively dialyzed against PBS, pH 7.4.

Size-exclusion FPLC was performed on a Superdex 200 10/300 column (GE-Healthcare, Les Ulis, France) calibrated with standards from Boehringer Mannheim (Meylan, France). The column was loaded with 350 µL of the sample (40 µg) to be analysed. Proteins were eluted with PBS at a rate of 0.5 mL/min, and detected by a UV detector at 280 nm. Eluted fractions (0.5 mL) were analysed by ELISA.

Protein concentration was evaluated using Micro-BCA protein assay (23235, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Preparations were analysed by SDS-PAGE on homogeneous 15% gel under reducing conditions and Western blotting using the anti-His₆ antibody (MA1-21315, Pierce, Courtaboeuf, France). This step was followed by incubation with a HRP conjugated goat anti-mouse IgG antibody (A4416, Sigma, Saint-Louis, MO, USA). Immunocomplexes were then detected using the diaminobenzidine/chloronaphtol substrate (Sigma, Saint-Louis, MO, USA).

3.4. Binding activity of the recombinant antibody fragments

3.4.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Plates were coated with 0.5 µg (100 µL) of *L. intermedia* venom in 0.02 M sodium bicarbonate buffer (pH 9.6) for 16 h at 4 °C and then saturated with 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1 h. Plates were then incubated for 2 h with periplasmic extracts (100 µL/well) diluted 1:10 in PBS pH 7.4 and then for 1 h with the anti-His₆ antibody. HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody was then added for 1 h. TMB substrate (N301, Thermo-Fisher, Courtaboeuf, France) was added (100 µL/well) for 15 min. A_{450nm} was read by an ELISA microplate reader. Between each intermediate step, wells were washed four times with PBS containing NaCl 150 mM and Tween 20 0.05%. All incubation steps were carried out at 37 °C. Negative controls were performed using periplasmic extracts of BL21DE3 bacteria transformed with empty plasmid pET22b(+). All assays were conducted in triplicate.

3.4.2. Electrophoresis and immunoblotting

Loxosceles venoms (5 µg) were separated by SDS-PAGE (15% polyacrylamide gel) under non-reducing conditions followed by silver staining or Western blotting after transfer to a 0.45 µm nitrocellulose membrane and blocking with 5% (w/v) non-fat dry milk and 0.3% (v/v) Tween 20 in PBS. Strips were incubated with periplasmic extracts. Staining was carried out as reported above.

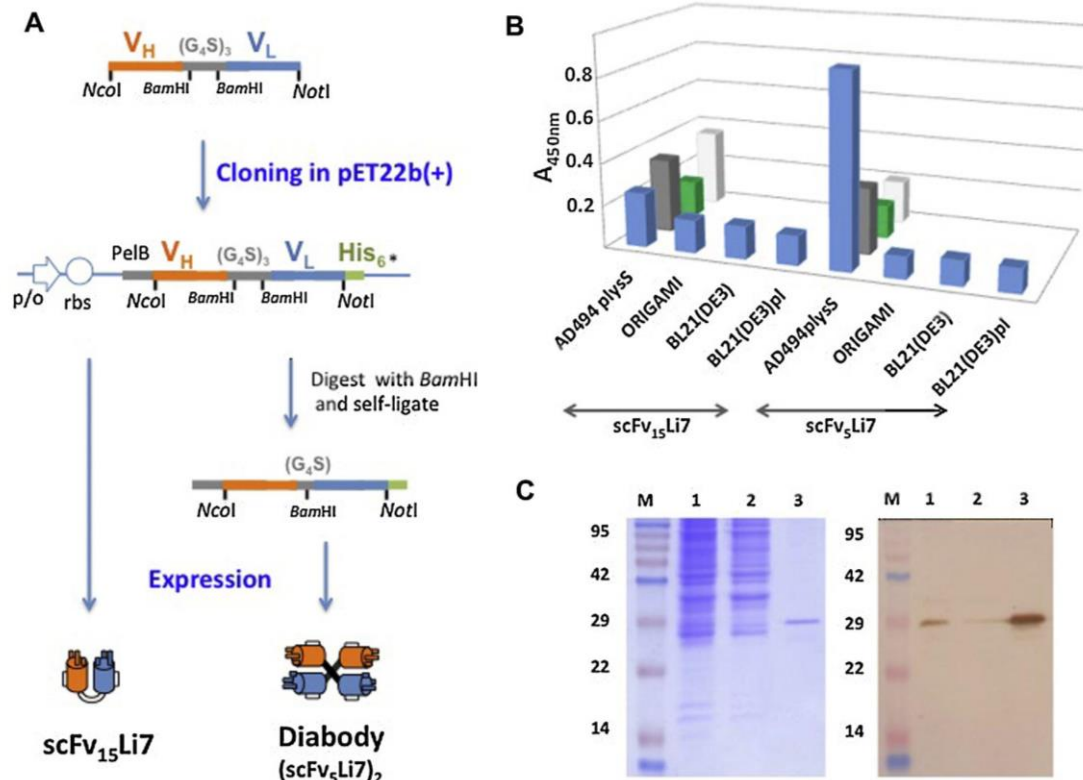


Fig. 1. Generation of LimAb7 antibody fragments and analysis of their expression. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(A) Schematic representation of the expression cassette for scFvs. The open reading frame is under the control of a T7 promoter and contains a pelB signal sequence for periplasmic expression, His₆ hexahistidine sequence used for purification and detection of the recombinant protein. cDNAs encoding V_H and V_L are fused together via a sequence encoding a (Gly₄Ser)₃ linker and cloned in frame between the pelB sequence and the His₆ tag. This allows expression of monomeric scFv₁₅Li7. Alternatively, double digestion of the vector with BamHI followed by self-ligation allows restriction of the linker to a (Gly₄Ser) sequence. This allows expression of dimeric (scFv₅Li7)₂, also called diabody.

(B) Expression of recombinant scFvs: periplasmic extracts containing scFvs were analysed in a direct ELISA against *L. intermedia* venom. Periplasmic extracts were prepared from various host cells induced and cultured in different media: 2XTY (blue); power (grey); superior (green) or turbo (white).

(C) Electrophoresis and Western blot analysis of recombinant scFv₅Li7 produced from AD494pIyS cultured and induced in 2XTY medium. M: Molecular weight markers; (1) periplasmic extract; (2) flow through fraction; (3) IMAC-purified scFv₅Li7.

Purified LimAb7 IgG was used as the positive control and immunocomplexes were revealed as previously reported [11].

3.4.3. Surface plasmon resonance (SPR)

BIACore T100 instrument and all reagents were obtained from GE Healthcare Life Sciences, Europe. rLiD1 was covalently attached to a CM5-sensorchip (approximately 8300 RU). Samples were then passed over the immobilized rLiD1 in PBS 150 mM NaCl (pH 7.4) at a flow rate of 30 μ L/min, at 25 $^{\circ}$ C, during 5 min. Two injections of 1 min of glycine-HCl pH 2.5 at 100 μ L/min were used to regenerate the sensorchip between the successive samples. Kinetic constants (k_{on} , k_{off}) were deduced from the analysis of association and dissociation rates of at least five different antibody concentrations. The dissociation constant K_D was calculated from $K_D = k_{off}/k_{on}$. Sensorgrams were analysed using the BIAevaluation version 2.0.2 software. All experiments were carried out in duplicate.

To assess the antigen-binding specificity of the scFv, manual runs were carried out in which purified scFv₅Li7 (6 μ g/mL) was preincubated with an excess of venom (60 μ g/mL) belonging to various *Loxosceles* species.

3.5. Neutralization of sphingomyelinase activity

Neutralization capacity was analysed using the Amplex[®] Red Sphingomyelinase Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). *L. intermedia* venom (0.25 μ g) was added to the Amplex[®] Red reagent mixture (100 μ L) and neutralization was performed with scFv₅Li7 (25–100 pmol). Reactions were performed at 37 $^{\circ}$ C for 30 min before measuring excitation/emission fluorescence at 550/590 nm in a fluorimeter (Spectramax M2-Molecular Devices). All samples were treated in duplicate. Fluorescence values were converted to SMaseD activity percent using the fluorescence value of the sample containing venom in the absence of the antibody.

3.6. Neutralization of the hemolytic activity

Blood from human donor was collected in tubes containing sodium citrate buffer (BD Plastipak, Franklin Lakes, NJ USA). The platelet-rich plasma and buffy coat were removed by aspiration after centrifugation at 200g for 15 min. Packed erythrocytes were washed three times with Ringer Solution (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 32 mM HEPES, 5 mM glucose, 1 mM CaCl₂, pH

7.4, 300 mOsm/kg H₂O) and redissolved at a final concentration of 10⁸ cells/mL. In order to evaluate the neutralization potential of the antibodies, 2.5 µg of venom were incubated with the antibody preparation (0–320 pmol). After 24 h of incubation with gentle agitation (37 °C), samples were centrifuged (3 min, 200g) and the A_{570 nm} of the supernatants was read. Samples were analysed in triplicate along with negative (Ringer Solution) and positive (distilled water containing 0.1% (v/v) Triton X-100) controls. Absorbance values were converted to hemolysis percent using the absorbance value of the positive control as 100% lysis.

4. Results

4.1. Antibody fragment engineering, expression, selection and purification

Since the best conditions for the expression of antibody Fv fragments cannot be determined solely on the basis of the class of protein, a simple screening was developed (Fig. 1). We designed two types of scFvs containing LimAb7 V-domains that differ from each other by the size of the linker that joins the VH and the VL domains. scFv₁₅Li7 and scFv₅Li7 designate scFvs containing the 15 residues (Gly₄Ser)₃ linker and the 5 residues (Gly₄Ser) linker respectively (Fig. 1A). We investigated the expression of both recombinant proteins after inducing their synthesis at equal cell densities with the cells in an exponential growth phase. We compared four strains grown in several media using a conventional periplasmic expression vector (pET22b(+)) and well-standardized conditions of expression [13]. A functional ELISA was used to track protein accumulation. Venom-binding activity was detected in all periplasmic extracts obtained from grown cells, whatever the strain while no signal was observed with periplasmic extracts from bacteria transformed with empty plasmid pET22b(+). The signal observed with cytoplasmic extracts and culture supernatants were low in any of the conditions tested here (data not shown). AD494plysS was identified as the best periplasmic producer (Fig. 1B). We further observed that the medium composition affected the relative level of active soluble protein that accumulates in the periplasm of AD494plysS while the cell densities did not differ much in each of the media. Out of the four media tested, 2XTY leads to the highest production level of functional antibody fragment, and the signal observed in the ELISA was three times greater for scFv₅Li7 as compared to scFv₁₅Li7 expression. For all these reasons, we decided to pursue the study with periplasmic extract of AD494plysS containing scFv₅Li7. The scFv was purified by IMAC-chromatography generating a yield of 200 µg/L from bacterial culture. The preparation appeared to be homogeneous when analysed by Western blot (Fig. 1C).

Size exclusion chromatography of scFv₅Li7 preparation revealed the presence of two major peaks. The first one was eluted at 14.5 mL and presented an apparent molecular mass of 50 kDa which is in agreement with the size of a dimer of scFv₅Li7 also called diabody. It was associated to a shoulder eluted at 13.75 mL possibly corresponding to a small fraction of trimer or higher oligomers. A second major peak was also observed with a retention volume (15.5 mL) similar to monomeric IMAC-purified scFv₁₅Li7 (25 kDa) used here as a control (Fig. 2A). Both fractions (diabody (scFv₅Li7)₂ and monomeric scFv₅Li7) were able to recognize *L. intermedia* venom in ELISA (Fig. 2B).

4.2. Binding to rLid1 and venoms

Binding avidity of purified scFv₅Li7 and kinetics for binding to rLid1 were analysed in real time (Fig. 3A and B). Using BIAevaluation software we observed that the data col-

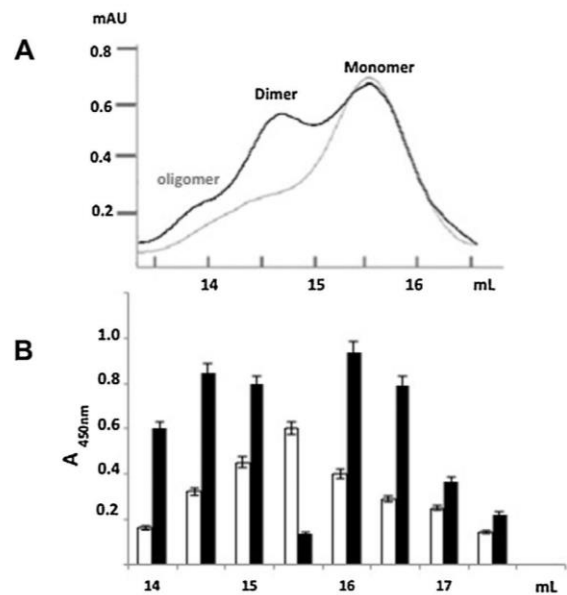


Fig. 2. scFv₅Li7 characterisation by size-exclusion chromatography on Superdex 200 10/300 column.

(A) The elution profile shows the various forms present in the IMAC-purified scFv₅Li7 preparation (black). Purified scFv₁₅Li7 was also used as a standard (grey). (B) Fractions eluted from the chromatography column were analysed in a direct ELISA against *L. intermedia* venom. scFv₅Li7 (black), scFv₁₅Li7 (white). Results are representative for two different experiments and expressed as mean of duplicates \pm SEM.

lected were not consistent with a classical 1:1 interaction model. According to FPLC analysis, the heterogeneous analyte model was used to fit kinetic data. The heterogeneous model consists of two populations of molecules capable to bind the immobilized rLid1. The on-rate and off-rate measured for the first population of active dimer were respectively $k_{on} = 2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{off} = 2.6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ resulting in a dissociation constant $K_{D1} = 0.98 \times 10^{-9} \text{ M}$ while the on-rate and off-rate measured for the second population of global monomer in the sample were respectively $k_{on} = 5.96 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{off} = 0.4622 \text{ s}^{-1}$ resulting in a dissociation constant $K_{D2} = 6 \times 10^{-6} \text{ M}$. Under the same conditions of analysis, IgG LimAb7 exhibited better kinetic characteristics with a $K_D = 8.5 \times 10^{-11} \text{ M}$ and a low dissociation rate ($k_{on} = 0.96 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{off} = 8.2 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$).

We also investigated whether the pre-incubation of IMAC-purified scFv₅Li7 with an excess of venom from various species of *Loxosceles* could inhibit the binding of scFv₅Li7 to rLid1 (Fig. 3C). We observed that incubation with *L. gaucho* or *L. laeta* venoms had no effect while the binding to rLid1 was completely inhibited by *L. intermedia* venom demonstrating that the antigen-binding specificity of LimAb7 was preserved by the recombinant scFv.

Finally, activity of scFv₅Li7 was also analysed by Western blot (Fig. 3D). Here again, scFv₅Li7 strictly reacted with *L. intermedia* venom and two bands of 32–35 kDa were observed suggesting that the epitope recognized is shared by several SMaseD isoforms, as well as in the case of the parental IgG.

4.3. SMaseD neutralization assays

We investigated the capacity of scFv₅Li7 to inhibit the sphingomyelinase activity of *L. intermedia* venom by measuring hydrolysis of sphingomyelin (Fig. 4A). SMaseD activity of the venom

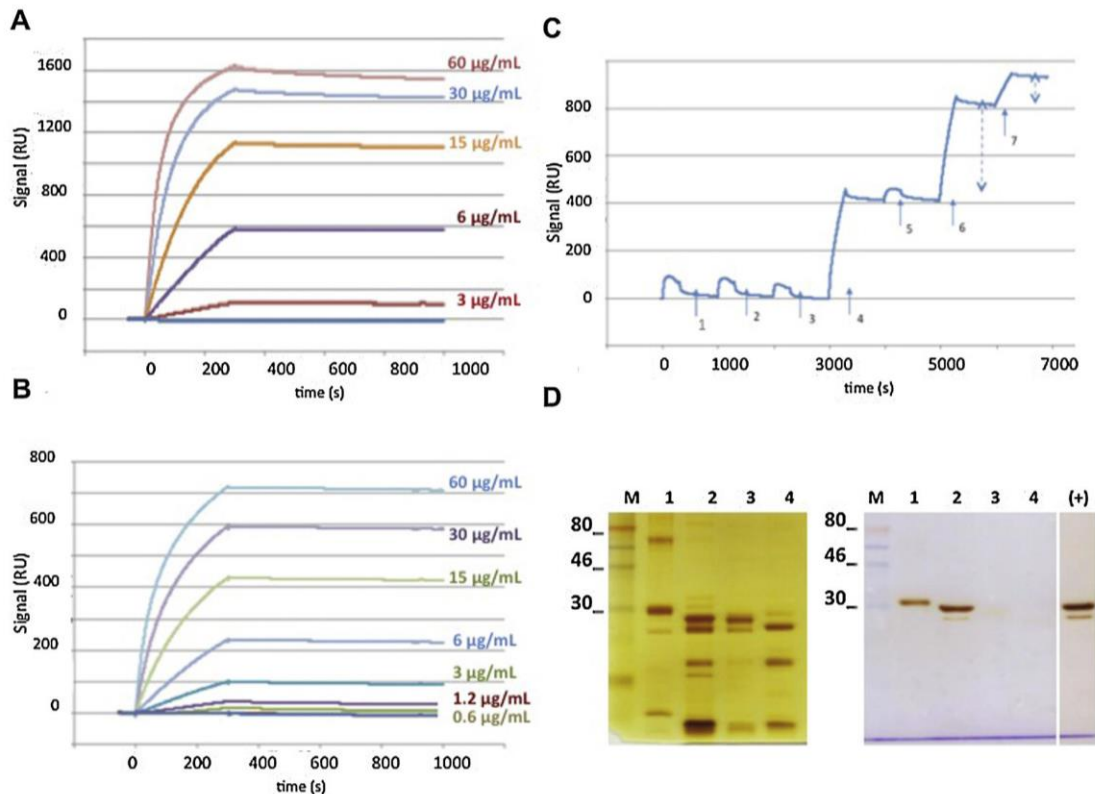


Fig. 3. Antigen-binding analysis of scFv5Li7.

(A and B) Interaction of immobilized rLiD1 with purified scFv5Li7 (A) was analysed by SPR in comparison with the parental IgG LimAb7 (B).

(C and D) Reactivity with venoms was analysed by SPR (C) and Western blot (D).

(C) Competition of immobilized rLiD1 with various venoms pre-incubated or not with purified scFv5Li7: (1) *L. intermedia*; (2) *L. intermedia* + scFv5Li7; (3) *L. laeta*; (4) *L. laeta* + scFv5Li7; (5) *L. gauchoi*; (6) *L. gauchoi* + scFv5Li7; (7) scFv5Li7. The only venom capable to inhibit scFv5Li7 interaction with rLiD1 is *L. intermedia* venom (2).

(D) Silver stained SDS-PAGE (left) or Western blot (right) developed with scFv5Li7. (M) Molecular weight markers; (1) rLiD1; (2) *L. intermedia* venom; (3) *L. gauchoi* venom; (4) *L. laeta* venom; (+) *L. intermedia* venom developed with IgG LimAb7.

was inhibited by the addition of scFv5Li7 in a concentration-dependent manner (91.7% inhibition for 100 pmol of scFv5Li7). LimAb7 (50 pmol) also inhibited the enzymatic activity of the venom but to a lower extent (66.7%).

4.4. Red cells hemolysis assays

We performed a hemolysis assay in order to assess the capacity of scFv5Li7 to inhibit the *L. intermedia* venom (Fig. 4B). Pre-incubation of the venom with increasing quantities of scFv5Li7 (45–320 pmol) induced a concentration-dependent inhibition of hemolysis (83.2% inhibition of the hemolysis induced by the crude venom for 320 pmol of scFv5Li7) even better than the parental IgG Li7 or the horse polyclonal serum anti-*L. intermedia* venom (320 pmol) in the assay conditions.

5. Discussion

Monoclonal murine antibody LimAb7 has been shown to bind *L. intermedia* venom proteins of 32–35 kDa and to neutralize the dermonecrotic activity of the venom in rabbits [11]. Here, we report the successful production of a scFv that preserves the same binding-specificity and neutralizes *in vitro* the sphingomyelinase and hemolysis activity of the crude venom. All together these

results pave the way to the design of recombinant antibody fragments with therapeutic potential. However, along the way, we have confronted unforeseen challenges that have to be discussed here.

Braddbury pointed out that many antibodies are not well-characterized and with more than one hundred co-signatories, he launched a call to define all binding reagents according to the sequence that encode them [14]. In this way, we validated here that the cross-reactivity of LimAb7 with several isoforms of *L. intermedia* dermonecrototoxins is driven by a unique antibody fragment and doesn't result from a careless hybridoma subcloning.

Our primary objective was to design an antibody building block that retains the main features of LimAb7 for binding and neutralizing *L. intermedia* dermonecrototoxins. Previous reports have demonstrated that engineering antibody fragments starting from hybridoma can advantageously challenge antibody-combinatorial libraries of which the panning often leads to antibody fragments with poor affinity and sometimes not soluble when expressed as free proteins [15]. Here, we joined LimAb7 V-domains via a linker of 5 or 15 residues. We anticipated that the use of a (Gly₄Ser) linker would preferentially lead to dimeric structures with increased size and valency and more adapted for detoxification [16–18]. First a simple empirical screening allowed us to identify ADA94plysS cells and 2XTY as the best available cell line and culture medium for expression of this particular scFv as judged by its functional

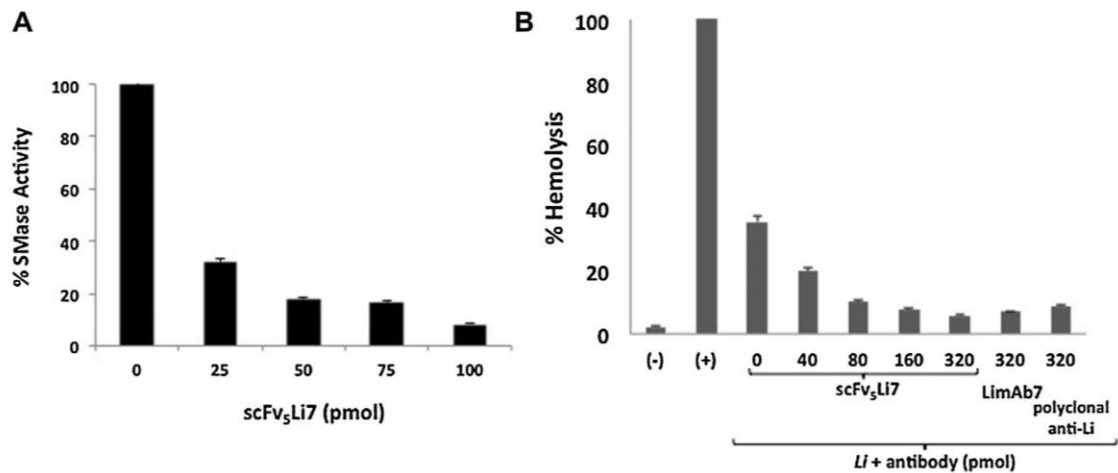


Fig. 4. *In vitro* neutralization of *L. intermedia* venom by IMAC-purified scFv₅Li₇ preparation.

(A) Inhibition of sphingomyelinase activity. *L. intermedia* venom (0.25 µg) was assayed alone or in presence of scFv₅Li₇. Results were expressed as percentage of SMaseD activity. Results are representative for two different experiments and expressed as mean of duplicates ±SEM.

(B) *In vitro* hemolytic assay. Human erythrocytes were incubated with *L. intermedia* (Li) venom in presence of scFv₅Li₇ (0–320 pmol), IgG LimAb7 (320 pmol) or polyclonal anti-*L. intermedia* antibody (320 pmol).

(–) Ringer buffer as a negative control. (+) 1% (v/v) Triton X-100 as a positive control (100% hemolysis). The results are expressed as percentage of lysis. Results are representative of two different experiments and expressed as mean of duplicates ±SEM.

activity, the highest yield of active scFv production being observed for scFv₅Li₇. Nevertheless, we observed that the production yield of scFv₅Li₇ remained quite low and even more surprising, the antibody fragment produced did not have a stable dimeric configuration. This was demonstrated by the gel filtration analysis of IMAC-purified scFv₅Li₇ which revealed two major subpopulations, one with an apparent Mr of 50 kDa and the other of 25 kDa. Both fractions were found to be able to bind to *L. intermedia* venom in ELISA, but real time SPR analysis also indicated that the overall affinity of the IMAC-purified scFv₅Li₇ for the target was altered as compared to the parental IgG LimAb7. We did not investigate the kinetic parameters of individual monomeric and dimeric scFv₅Li₇ for binding to rLiD1 in SPR because we considered that the existence and the ratio between both forms may vary upon dilution and also may be dependent on external parameters such as temperature, ionic strength, pH and others that will have to be optimized in future developments [19,20].

There is no doubt that the decreased affinity observed is inherently related to the lack of stability of the diabody and the structure of the linker so far designed which is neither optimal for correct folding of the scFv in a stable and dimeric nor monomeric form. Indeed, diabody stability depends on the intrinsic stability of the VL and VH domains but also on the stability of the interface. The second is mainly influenced by the orientation of the antibody V-domains, the size and the sequence of the linker that must favour correct interaction of amino acid residues at the VH/VL interface [16,21]. In a VH/VL orientation, the (Gly₄Ser) linker is usually considered to favour the formation of dimeric structures because it makes sterical constraints which prevent the VH domain from interacting with its attached VL domain and make it difficult to form monomeric scFv with the natural Fv orientation [22]. However, whether this linker may alter the correct pairing of VH and VL, from two distinct subunits, remains questionable. It is also admitted that intermediate size linkers, including 5–20 residues, can lead to mixed populations during *in vivo* expression depending on individual V-domain sequences. In addition to the size, it is established that subtle differences in linker sequence can dramatically influence the production, stability and recognition properties of the scFv molecule [23]. Our

results demonstrate that linker size and sequence still remains to be improved for expression of scFv₅Li₇ in a pure and stable dimeric form.

While using a 5 residues linker, Rodriguez-Rodriguez *et al.* demonstrated that a single mutation (E43G) in VH-FR2 of scFv₅6009F significantly improved the stability of the dimeric structure with positive consequences on its functional properties [24]. Future developments, directed evolution and fine 3-D structure analysis will help to understand these problems. Such studies are also required to design stable therapeutic humanized antibody fragments with homogeneous pharmacokinetic properties. Otherwise, they might not be retained for a reasonable time and a too rapid clearance associated with unstable antibody/toxin immunocomplexes would be a problem in clinical applications.

Despite these unforeseen difficulties, the expression system used yielded material of good enough quality for the rapid evaluation of scFv₅Li₇ neutralizing activity against the venom. In both assays, neutralization of SMase activity or hemolysis, scFv₅Li₇ exhibited inhibition properties to the same extent as mAbLi₇ or horse polyclonal antivenoms, demonstrating that the decreased affinity of scFv₅Li₇ for rLiD1 did not have significant adverse consequences for *in vitro* application.

In conclusion, this report underlines some difficulties that can be encountered in the design of diabodies and demonstrates that there is not yet a generic strategy for the design of stable diabodies, each antibody fragment being a particular case of scFvs [25]. The scFv₅Li₇ designed here preserves the capacity to neutralize the venom of *L. intermedia* which is responsible for serious envenomings in South America. It can be considered as the first stone positioned toward the design of therapeutic humanized antibodies and points out some structural features that will have to be considered in order to facilitate the rapid design and pharmaceutical development of such molecules.

Compliance with ethical standards

All procedures performed in studies involving samples from human origin were in accordance with the guidelines of the

Research Ethics Committee of the Human UFPR (N°06-09 CEP). This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by CAPES (Toxinologia 23038000825/2011-63), Fundação Araucária (442/2014) and CNPq (472460/2013-7, 314441/2014-0, 401355/2014-4). We are indebted to Rafaela Fogaça for discussion and critical reading of the manuscript.

References

- [1] E. Marques-da-Silva, M.L. Fischer, *Loxosceles Heineken & Lowe 1835 (Araneae: Sicariidae) species distribution in the State of Paraná, Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 (4) (2005) 331–335.
- [2] D.R. Buch, F.N. Souza, G.O. Meissner, A.M. Morgon, L.H. Gremski, V.P. Ferrer, D. Trevisan-Silva, F.H. Matsubara, M. Boia-Ferreira, Y.B. Sade, D. Chaves-Moreira, W. Gremski, S.S. Veiga, O.M. Chaim, A. Senff-Ribeiro, Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: evaluation of biological conservation by immune cross-reactivity, *Toxicon* 108 (2015) 154–166.
- [3] D.V. Tambourgi, R.M. Gonçalves-de-Andrade, C.W. van den Berg, *Loxoscelism from basic research to the proposal of new therapies, Toxicon* 56 (7) (2010) 1113–1119.
- [4] I. Pauli, J. Puka, I.C. Gubert, J.C. Minozzo, The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment, *Toxicon* 48 (2) (2006) 123–137.
- [5] D.M. de Almeida, M.e.F. Fernandes-Pedrosa, R.M. de Andrade, J.R. Marcelino, H. Gondo-Higashi, I.E.L. de Azevedo, P.L. Ho, C. van den Berg, D.V. Tambourgi, A new anti-loxoscelic serum produced against recombinant sphingomyelinase D: results of preclinical trials, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79 (3) (2008) 463–470.
- [6] A. Casadevall, E. Dadachova, L.A. Pirofski, Passive antibody therapy for infectious diseases, *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (9) (2004) 695–703.
- [7] D.M. Ecker, S.D. Jones, H.L. Levine, The therapeutic monoclonal antibody market, *MAbs* 7 (1) (2015) 9–14.
- [8] M. Mousli, C. Devaux, H. Rochat, M. Goyffon, P. Billiald, A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*, *FEBS Lett.* 442 (2–3) (1999) 183–188.
- [9] L.M. Alvarenga, M. Zahid, A. di Tommaso, M.O. Juste, N. Aubrey, P. Billiald, J. Muzard, Engineering venom's toxin-neutralizing antibody fragments and its therapeutic potential, *Toxins (Basel)* 6 (8) (2014) 2541–2567.
- [10] A.O. Carmo, M. Chatzaki, C.C. Horta, B.F. Magalhães, B.B. Oliveira-Mendes, C. Chávez-Olortegui, E. Kalapothakis, Evolution of alternative methodologies of scorpion antivenoms production, *Toxicon* 97 (2015) 64–74.
- [11] L.M. Alvarenga, M.S. Martins, J.F. Moura, E. Kalapothakis, J.C. Oliveira, O.C. Mangili, C. Granier, C. Chávez-Olortegui, Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay, *Toxicon* 42 (7) (2003) 725–731.
- [12] I. Jiacomini, S.K. Silva, N. Aubrey, J. Muzard, C. Chavez-Olortegui, J. De Moura, P. Billiald, L.M. Alvarenga, Immunodetection of the brown spider (*Loxosceles intermedia*) dermonecrotin with an scFv-alkaline phosphatase fusion protein, *Immunol. Lett.* 173 (2016) 1–6.
- [13] C. Fields, D. O'Connell, S. Xiao, G.U. Lee, P. Billiald, J. Muzard, Creation of recombinant antigen-binding molecules derived from hybridomas secreting specific antibodies, *Nat. Protoc.* 8 (6) (2013) 1125–1148.
- [14] A. Bradbury, A. Plückthun, Reproducibility standardize antibodies used in research, *Nature* 518 (7537) (2015) 27–29.
- [15] D.F. Cardoso, F. Nato, P. England, M.L. Ferreira, T.J. Vaughan, I. Mota, J.C. Mazie, V. Choumet, P. Lafaye, Neutralizing human anti crotoxin scFv isolated from a nonimmunized phage library, *Scand. J. Immunol.* 51 (4) (2000) 337–344.
- [16] J.S. Huston, D. Levinson, M. Mudgett-Hunter, M.S. Tai, J. Novotný, M.N. Margolies, R.J. Ridge, R.E. Brucoleri, E. Haber, R. Crea, Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 (16) (1988) 5879–5883.
- [17] P. Holliger, T. Prospero, G. Winter, Diabodies: small bivalent and bispecific antibody fragments, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (14) (1993) 6444–6448.
- [18] N. Aubrey, C. Devaux, P.Y. Sizaret, H. Rochat, M. Goyffon, P. Billiald, Design and evaluation of a diabody to improve protection against a potent scorpion neurotoxin, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (3) (2003) 617–628.
- [19] B.C. Huang, L.J. Foote, T.K. Lankford, S.M. Davern, C.K. McKeown, S.J. Kennel, A diabody that dissociates to monomer forms at low concentration: effects on binding activity and tumor targeting, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327 (4) (2005) 999–1005.
- [20] A. Wörn, A. Plückthun, Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments, *J. Mol. Biol.* 305 (5) (2001) 989–1010.
- [21] R.E. Bird, K.D. Hardman, J.W. Jacobson, S. Johnson, B.M. Kaufman, S.M. Lee, T. Lee, S.H. Pope, G.S. Riordan, M. Whitlow, Single-chain antigen-binding proteins, *Science* 242 (4877) (1988) 423–426.
- [22] M. Koti, E. Nagy, A.K. Kaushik, A single point mutation in framework region 3 of heavy chain affects viral neutralization dynamics of single-chain Fv against bovine herpes virus type 1, *Vaccine* 29 (45) (2011) 7905–7912.
- [23] Y. Tang, N. Jiang, C. Parakh, D. Hilvert, Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology, *J. Biol. Chem.* 271 (26) (1996) 15682–15686.
- [24] E.R. Rodríguez-Rodríguez, L.M. Ledezma-Candanoza, L.G. Contreras-Ferrat, T. Olamendi-Portugal, L.D. Possani, B. Becerril, L. Riaño-Umbarila, A single mutation in framework 2 of the heavy variable domain improves the properties of a diabody and a related single-chain antibody, *J. Mol. Biol.* 423 (3) (2012) 337–350.
- [25] D. Lu, X. Jimenez, L. Witte, Z. Zhu, The effect of variable domain orientation and arrangement on the antigen-binding activity of a recombinant human bispecific diabody, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318 (2) (2004) 507–513.

ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO

Immunology Letters 173 (2016) 1–6



Contents lists available at ScienceDirect

Immunology Letters

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/immlet

Immunodetection of the “brown” spider (*Loxosceles intermedia*) dermonecrotic toxin with an scFv-alkaline phosphatase fusion protein



Isabella Jiacomini^a, Sabrina K. Silva^a, Nicolas Aubrey^b, Julien Muzard^c,
Carlos Chavez-Olortegui^d, Juliana De Moura^a, Philippe Billiald^{c,e,*},
Larissa M. Alvarenga^{a,*,**}

^a Laboratório de Imunoquímica, Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba CEP 81531-980, PR, Brazil

^b Université de Tours–INRA UMR 1282, Infectiologie et Santé Publique, 37200 Tours, France

^c Muséum national d'Histoire naturelle, UMR MNHN-CNRS 7245, 12 rue Buffon, Paris 75231, France

^d Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^e Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.-B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 November 2015

Received in revised form 16 February 2016

Accepted 2 March 2016

Available online 10 March 2016

Keywords:

Loxosceles sp.

Immunoassay

scFv

Immunotracer

Detection

Quantification

ABSTRACT

Bites by spiders from *Loxosceles* genus often lead to a wide variance in envenomation profile of patients and diagnosis is difficult due to the number of diseases that mimic loxoscelism. In such a context, it is of interest to consider the design of standardized recombinant colorimetric antibodies for diagnosis and specific detection of individual circulating toxins in biological fluids of envenomed patients. We have previously prepared a monoclonal murine IgG (LiMab7) that reacts with *Loxosceles intermedia* venom components of 32–35 kDa and neutralizes the dermonecrotic activity of the venom. Here, we re-engineered LiMab7 into a colorimetric bifunctional protein consisting in the corresponding single-chain antibody fragment (scFv) fused to alkaline phosphatase (AP) of *Escherichia coli*. The immune tracer was tested in two different types of immunoassays and it proved to be efficient in both. Thus, this recombinant fusion protein (scFv-LiMab7/AP) can be used for rapid and specific immunotitration of *L. intermedia* venom with a linear range of 39–20000 ng/mL and a detection limit of 39 ng/mL without any cross-reaction.

© 2016 European Federation of Immunological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

“Brown recluse”, “brown fiddler”, “fiddleback”, “violin” or “recluse” spider in North America or, simply, “brown” spider in South America, are some popular names used to refer to arachnids of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae), although they can be found worldwide [1].

Even though the genus *Loxosceles* comprises more than 100 species and all of them are probably capable of producing medically significant bites, the major spider responsible for envenomation in United States is *Loxosceles reclusa*, while *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* and *Loxosceles laeta* are considered to be the most important from a medical point of view in South America [2–5].

In Brazil, the brown spider envenoming is considered as a serious public health threat due to the number of cases recorded annually. In 2012, 25,329 spider bites were recorded. It is estimated that approximately 50% of these bites are caused by spiders belonging to the genus *Loxosceles* [6].

Typically, clinical picture is a necrotizing-hemolytic syndrome starting with local oedema and ischemia at the bite site followed by frank necrosis (eschar) within days and occasionally extended necrotic areas over weeks. A small subset of patients can even have a more severe systemic response causing hemolysis and rhabdomyolysis with subsequent anemia, renal failure and hematuria which may be more pronounced in children [7,8].

Loxoscelism diagnostic is tedious because bites often go unnoticed. The early clinical signs are not specific and by the time a necrotic lesion develops it may be too late for interventions and full rescue. Therefore, laboratory immunoassays should be developed beside to conventional clinical tests in order to facilitate the specific detection of the toxins into biological fluids. Such immunoassays, more likely ELISA, are usually developed using conventional antibodies (polyclonal or monoclonal) with several drawbacks: (i) maintaining a reproducible source of polyclonal antibodies is

* Corresponding author at: Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.-B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

** Corresponding author at: Universidade Federal do Paraná, Curitiba CEP 81531-980, PR, Brazil.

E-mail addresses: billiald@mnhn.fr (P. Billiald), lmalvarenga@ufpr.br (L.M. Alvarenga).



SORO ANTILOXOSCÉLICO
POLIESPECÍFICO
(Anti - L. laeta, L. gaucho e L. intermedia)

FORMA FARMACÊUTICA E APRESENTAÇÃO

O **SORO ANTILOXOSCÉLICO** é uma solução injetável de Fração F(ab')₂ de imunoglobulinas específicas purificadas, a ser administrada por via intravenosa, que conferem imunidade passiva. São derivadas de plasmas de equinos hiperimunizados com venenos de aranhas das espécies *Loxosceles laeta*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles intermedia*.

É apresentado em frasco ampola de 5 mL em caixa contém 5 unidades.

USO PEDIÁTRICO E ADULTO

COMPOSIÇÃO

Cada frasco ampola com 5 mL contém:

- Fração F(ab')₂ de imunoglobulinas que neutralizam no mínimo 75 DMN (Dose Mínima Necrotante) de veneno de aranhas das espécies *Loxosceles laeta*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles intermedia*.
- Fenol (máximo).....17,5 mg
- Solução fisiológica q.s.p..... 5 mL

INFORMAÇÕES AO PACIENTE

1. Como este medicamento funciona?

Os anticorpos, frações F(ab')₂ das imunoglobulinas específicas contidos no soro, ligam-se especificamente às toxinas do veneno, neutralizando-as. Conforme dados existentes na literatura, quanto mais precoce for a administração do soro maior é a sua eficácia terapêutica, desta forma, o tratamento deve ser iniciado o mais rápido possível.

2. Por que este medicamento foi indicado?

Este soro contém anticorpos específicos com capacidade de neutralizar o efeito dos envenenamentos causados por picadas de aranha (marrom), gênero *Loxosceles*, das três espécies mais importantes na América do Sul e Brasil do ponto de vista médico (L. laeta, L. intermedia e L. gaucho).

3. Quando não devo usar este medicamento?
Contra-indicações praticamente não existem. Nos pacientes com antecedentes alérgicos ou que já tenham feito uso de soro de origem equina, a infusão intravenosa do Soro AntiLoxoscélico deverá ser feita em

condições de estrita assistência médica, para observar o aparecimento de reações e iniciar o tratamento indicado.

Advertências

O Soro AntiLoxoscélico deve ser aplicado sob supervisão médica, pela via intravenosa, seguindo as doses recomendadas (VERE POSOLOGIA), sob a forma de infusão lenta e em AMBIENTE HOSPITALAR, pois pode desencadear reações alérgicas, de intensidade variáveis, algumas delas potencialmente graves como choque anafilático.

Precauções

O uso do Soro AntiLoxoscélico na gravidez não é contra-indicado, porém o médico deve ser sempre informado, bem como se estiver amamentando. Informe ao médico se for portador de insuficiência cardíaca. Interdições: Medicamentosos e alimentares. Não existem informações que contra indiquem o uso de soro com outros medicamentos, porém todo o medicamento que estiver sendo utilizado pelo paciente deverá ser informado ao médico.

A alimentação prévia e/ou ingestão de bebidas alcoólicas não contra indicam o uso, mas impõe cuidado mais rigoroso desses pacientes pelo risco de complicações relacionadas a vômito (aspiração). A via de administração é sempre a intravenosa, porque proporciona melhores resultados em tempo mais curto. Nas crianças, os acidentes são mais graves e a dose de soro utilizada não deve ser inferior à usada para adulto.

- Não há contra-indicação relativa a falhas e/ou reações.
- Informe ao médico o aparecimento de reações indesejáveis.
- Informe ao seu médico se você está fazendo uso de algum outro medicamento.

4. Como devo usar este medicamento?

USO RESTRITO A HOSPITAIS

Aspecto físico e características organolépticas

A solução injetável contida no frasco ampola deve ser límpida e transparente.
Este produto não deve ser usado se houver burbujão ou presença de precipitados.

Posologia

Caracterizado o acidente loxoscélico, a soroterapia deverá ser instituída o mais precocemente possível e a dose a ser aplicada varia de acordo com a gravidade do caso, conforme recomendação do Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos do Ministério da Saúde (1999). A necessidade de doses adicionais deverá ser avaliada de acordo com a evolução do quadro clínico. Para o sucesso do tratamento, o acidentado deve procurar imediatamente o serviço médico para obtenção de diagnóstico rápido e início da soroterapia quando indicado.

Não use o medicamento com prazo de validade vencido. Antes de usar observe o aspecto do medicamento.

6. Quais os males que este medicamento pode causar?

A administração de soros hiperimunes pode ser acompanhada de reações do tipo alérgico, de graus variáveis. As mais frequentemente observadas são: prurido/ruído cutâneo, urticária, tosse secarouquidilo, náuseas/vômito, crise asmatoide. Reações graves são pouco frequentes. Nestes casos, os pacientes podem apresentar arritmias cardíacas, hipotensão arterial, choque e/ou quadro obstrutivo das vias respiratórias. O choque anafilático foi descrito em 1:50.000 pacientes que fizeram uso do soro equino. Se surgir qualquer reação inesperada após o uso do soro procure imediatamente o serviço médico.

8. O que fazer se alguém usar uma grande quantidade deste medicamento de uma só vez?
A dose a ser aplicada varia de acordo com a gravidade do caso sendo estabelecida e administrada pelo médico. Não existem informações de casos e/ou consequências da aplicação de superdoses de Soro AntiLoxoscélico.

7. Onde e como devo guardar este medicamento?
O Soro AntiLoxoscélico deve ser conservado na temperatura de refrigeração, de 2 a 8 °C.

O SORO NÃO DEVE SER COLOCADO NO CONGELADOR OU FREEZER, O CONGELAMENTO É CONTRA-INDICADO.

Todo medicamento deve ser mantido fora do alcance das crianças e/ou animais.
Este medicamento, depois de aberto, deverá ser armazenado imediatamente. Compareça ao serviço médico nos prazos estabelecidos para o retorno possibilitando acompanhamento médico adequado.